Analyse von Sammelproben und Enterobacteriaceae als Index-Mikroorganismen

Ein Beitrag zur Rationalisierung der Untersuchung von Trockenmilchprodukten auf Salmonellen

Heinz Becker

1981

Aus dem Institut für Hygiene und Technologie
der Lebensmittel tierischen Ursprungs
(Lehrstuhl: Prof. Dr. G. Terplan)
der Tierärztlichen Fakultät der Universität München

Analyse von Sammelproben und Enterobacteriaceae als Index-Mikroorganismen

Ein Beitrag zur Rationalisierung der Untersuchung von Trockenmilchprodukten auf Salmonellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der tiermedizinischen Doktorwürde
der Tierärztlichen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

von

Heinz Becker

aus

Bad Godesberg

München 1981

Gedruckt mit Genehmigung der Tierärztlichen Fakultät
der Universität München

Dekan:	Prof. Dr. J. von Sandersleben
Referent:	Prof. Dr. G. Terplan
Korreferent:	Prof. Dr. H. Mahnel
Tag der Promotion:	24. Juli 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Druck: Dissertationsdruck Novotny jr., 8135 Söcking/Starnberg

Inhaltsverzeichnis

		Seite
1.	Einleitung	1
2.	Schrifttum	2
2.1	Taxonomie und biochemische Eigenschaften der Salmonellen	2
2.1.1	Stellung der Salmonellen innerhalb der Familie der Enterobacteriaceae	2
2.1.2	Kauffmann-White-Schema	4
2.1.3	Biochemische Reaktionen	4
2.1.3.1	Biochemisches Verhalten gegenüber Lactose	5
2.1.3.2	Nachweis lactosepositiver Varianten	7
2.2	Faktoren, die Wachstum und Überleben von Salmonellen beeinflussen	10
2.2.1	pH-Wert	10
2.2.2	Temperatur	11
2.2.3	Wasseraktivität	13
2.2.4	Lagerung	15
2.3	Natürlicher Lebensraum und Reservoire von Salmonellen und ihre Verbreitung über Lebens- und Futtermittel	17
2.4	Salmonellen als Ursache von Lebensmittelvergiftungen	18
2.4.1	Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen	18
2.4.2	Anteil der durch Milch und Milchprodukte hervorgerufenen Salmonellosen an deren Gesamtzahl	21
2.4.3	Durch Trockenmilchprodukte bedingte Salmonellosen	22
2.4.4	Infektiöse Dosis	24
2.4.5	Salmonellen-Toxine	25
2.4.6	Enteritis infectiosa	25
2.5	Aspekte des Nachweises von Salmonellen in Trockenmilchprodukten	26
2.5.1	Subletale Schädigung von Salmonellen und ihr Einfluß auf den Nachweis	26
2.5.2	Probenpläne	32
2.5.3	Rationalisierung des direkten Nachweises von Salmonellen durch Untersuchung von Sammelproben	36

Seite

2.5.4	Enterobacteriaceae als Index-Mikroorganismen für die Anwesenheit von Salmonellen	39
3.	Eigene Untersuchungen	43
3.1	Vergleich der Enterobacteriaceae Most Probable Number mit dem Nachweis von Salmonellen in Milchprodukten	43
3.1.1	Material	43
3.1.2	Methodik	43
3.1.2.1	Nachweis von Salmonellen	43
3.1.2.2	Nachweis von Enterobacteriaceae	46
3.1.2.3	Herkunft der für den Nachweis von Salmonellen und Enterobacteriaceae verwendeten Nährböden und Reagenzien	48
3.1.3	Ergebnisse	52
3.2	Sicherheit der Untersuchungen auf Salmonellen bei Prüfung von Sammelproben statt Einzelproben	59
3.2.1	Untersuchungen von Sammelproben aus natürlich kontaminierten Trockenmilchprodukten	59
3.2.1.1	Material und Methodik	59
3.2.1.2	Ergebnisse	60
3.2.2	Untersuchung von Sammelproben aus künstlich kontaminierten Trockenmilchprodukten	62
3.2.2.1	Material und Methodik	62
3.2.2.2	Ergebnisse	64
4.	Besprechung der Ergebnisse und Diskussion	68
5.	Zusammenfassung / Summary	84
6.	Literaturverzeichnis	88

1. Einleitung

Unter den bakteriell bedingten Lebensmittelvergiftungen stehen die Salmonellosen weltweit mit an erster Stelle. Sind auch Milch und Milchprodukte nur zu einem geringen Teil daran beteiligt (in der Bundesrepublik Deutschland im Jahre 1977 nach PÖHN (1980) z.B. zu 2,3 %), so zeigen doch die Erfahrungen der letzten Jahre, daß im Fall der Trockenmilchprodukte häufig besonders exponierte Verbrauchergruppen (z.B. Kleinkinder, Kranke, Senioren) davon betroffen sind. Für den Hersteller ergibt sich hieraus die Notwendigkeit, bei der Qualitätskontrolle derartiger Produkte auch die Untersuchung auf Salmonellen einzubeziehen. Da es nicht möglich ist, die gesamte Produktion zu prüfen, muß man sich auf Stichprobenuntersuchungen beschränken, die bei Anwendung geeigneter Probenpläne und Untersuchungsmethoden dem Verbraucher zwar keine Garantie für die 100%ige Abwesenheit dieser Keime geben können, wohl aber einen weitestgehenden Schutz vor gesundheitlichen Schäden. Entsprechend dem für diese Zwecke entwickelten FOSTER-Plan ist z.B. bei Abwesenheit von Salmonellen in 60 zufallsgemäß gezogenen Proben à 25 g davon auszugehen, daß mit 95%iger Wahrscheinlichkeit nicht mehr als eine Salmonelle in 500 g des Produktes enthalten ist und bei derartig geringer Salmonella-Kontamination auch für den o.a. Verbraucherkreis kein gesundheitliches Risiko besteht. Aufgrund des für derartige Untersuchungen erforderlichen hohen Arbeits- und Materialaufwandes sind verschiedene Vorschläge zur Rationalisierung entwickelt worden. Einer beruht auf der Untersuchung von einer oder wenigen Sammelproben statt vieler Einzelproben, ein anderer auf dem Nachweis von Enterobacteriaceae als Index-Mikroorganismen für die mögliche Anwesenheit von Salmonellen.

Da beide Empfehlungen bezüglich ihrer Eignung für die Untersuchung von Trockenmilchprodukten bisher noch nicht umfassend geprüft wurden, war es Ziel dieser Arbeit, hierzu durch entsprechende Untersuchungen an Trockenmilchprodukten unterschiedlicher Herkunft bzw. an künstlich mit Salmonellen kontaminiertem Material einen Beitrag zu leisten.

2. Schrifttum

2.1 Taxonomie und biochemische Eigenschaften der Salmonellen

2.1.1 Stellung der Salmonellen innerhalb der Familie der Enterobacteriaceae

Entsprechend der achten Auflage von Bergey's Manual of Determinative Bacteriology (BUCHANAN und GIBBONS, 1974) gehört das Genus Salmonella mit einer Vielzahl von Species oder Serotypen zum Tribus Escherichieae der Familie der Enterobacteriaceae (COWAN, 1974), von dieser Einteilung weicht jene von EDWARDS und EWING (1972) insofern ab, als das Genus Salmonella nicht dem Tribus Escherichieae, sondern dem Tribus Salmonelleae zugeordnet wird und nur aus drei Species besteht (Tab. 1).

Tabelle 1: Taxonomische Einordnung der Salmonellen innerhalb der Familie der Enterobacteriaceae nach EDWARDS und EWING (1972)

Tribus:	Salmonelleae	
Genus:	I	Salmonella
Species:	1.	S. cholerae-suis
	2.	S. typhi
	3.	S. enteritidis (mit Bio- und -serotypen)
	II	Arizona
	III	Citrobacter

Die zum Genus Salmonella gehörenden Bakterien sind gramnegative, bewegliche oder unbewegliche (S. gallinarum, S. pullorum), nicht sporenbildende Stäbchen, die (außer S. typhi, S. gallinarum) Glucose unter Gasbildung abbauen und keine Cytochromoxidase besitzen (COWAN, 1974).

KAUFFMANN (1960) unterteilt das Genus Salmonella nach biochemischen Kriterien (Tab. 2) in Subgenera. Diese setzen sich dann jeweils aus einer

Tabelle 2: Vereinfachte biochemische Differentialdiagnose der 4 Salm. sub-genera (nach ROHDE, 1967)

Sub-genus	Lactose	Dulcit	d-Tartrat	Malonat	Gelatine	KCN	LDC
I	–	+	+	–	–	–	+
II	–	+	– od. x	+	+	–	+
III (Arizona)	+ od. x	–	– od. x	+	+	–	+
IV	–	–	– od. x	–	+	+	+

Zeichen: + = positiv nach 1 Tag
– = negativ
x = spät u. unregelmäßig

Vielzahl von Species zusammen, welche "Gruppen verwandter sero-fermentativer-Phag-Typen" darstellen (KAUFFMANN, 1964).

Die bezüglich der Taxonomie gegebenen uneinheitlichen Auffassungen lassen sich z.B. daran erkennen, daß die "Arizona-Bakterien" von EDWARDS und EWING (1972) als Genus mit eigenem Antigenschema (EDWARDS et al., 1965) angesehen werden, nach KAUFFMANN (1965) und ROHDE (1979) das Subgenus III des Genus Salmonella repräsentieren und nach Bergey's Manual (COWAN, 1974) eine Species des Genus Salmonella darstellen (S.arizonae). HABS (1979) plädiert allerdings vom klinischen und epidemiologischen Standpunkt gesehen für die Aufrechterhaltung eines eigenen Genus. Ein weiterer Unterschied ist bezüglich der Zuordnung der Salmonellen zu Species oder Serotypen zu erkennen. KAUFFMANN (1975) betrachtet z.B. S. senftenberg als Species, nach EDWARDS und EWING (1972) wäre S.senftenberg ein Serotyp von S.enteritidis; Bergey's Manual wiederum läßt beide Bezeichnungen zu (COWAN, 1974).

Im folgenden wird, wie in der neueren Literatur allgemein üblich, stets der Begriff Serotyp - und nicht Species - verwendet werden, allerdings

ersetzt durch den im International Code of Nomenclature of Bacteria (LAPAGE et al., 1975) empfohlenen Terminus Serovar. Da im deutschen Sprachraum keine Vorschriften bezüglich Geschlecht, Deklination und Plural dieses Wortes existieren, wird den 1976 von HABS vorgeschlagenen und nach seinen Angaben auch von schweizerischer und österreichischer Seite akzeptierten Regeln für die Eindeutschung gefolgt. Demnach ist entsprechend dem Stammwort Varietät das Geschlecht weiblich - also die Serovar(ietät), die Deklination erfolgt ohne Endung und der Plural lautet die Serovaren (Serovarietäten).

2.1.2 Kauffmann-White-Schema

Die Abweichungen in der Taxonomie spielen für das Kauffmann-White-Schema, also für die serologische Einordnung der bislang bekannt gewordenen Serovaren, keine Rolle. In diesem Schema werden einheitlich die Serovaren nach ihren O-(Körper-) und H-(Geißel-) Antigenen eingeteilt. Die O-Antigene (mit arabischen Ziffern bezeichnet) erlauben eine Zusammenfassung in sogenannte O-Gruppen. Die H-Antigene treten in zwei Phasen auf, die mit kleinen lateinischen Buchstaben, gegebenenfalls versehen mit einem Zahlenindex, bezeichnet werden. So lautet beispielsweise die Antigenformel für die Serovar S. braenderup 6,7:e,h:e, n, **z**15 (KAUFFMANN, 1975). Die Ziffern 6 und 7 bezeichnen Körperantigene, die Buchstaben e und h Geißelantigene der Phase 1, die Buchstaben e, n, z15 die der Phase 2. Die Antigenformel enthält nicht die Gesamtzahl der Antigene der jeweiligen Serovar, sondern nur die zu einer sicheren Identifizierung notwendigen (COWAN, 1974).

S. typhi, S. paratyphi C und S. dublin besitzen außerdem ein Kapselantigen, das sogenannte Vi-Antigen (BRYAN et al., 1979).

2.1.3 Biochemische Reaktionen

Die in der Laborpraxis wichtigsten biochemischen Reaktionen von Salmonellen sind in Tabelle 3 wiedergegeben. Anzumerken wäre noch, daß sich S. typhi von allen anderen Salmonellen bezüglich einiger biochemischer

Reaktionen unterscheidet (BRYAN et al., 1979), worauf hier jedoch nicht näher eingegangen werden soll.

Tabelle 3: Biochemische Reaktionen von Salmonellen - außer Arizona - (nach EDWARDS und EWING, 1972)

Test oder Substrat	Kenn-zeichen	% pos.
Indol	-	1,1
Methylrot	+	100
Voges-Proskauer	-	0
Harnstoff	-	0
Lysindecarboxylase	+	94,6
Lactose	-	0,8
Saccharose	-	0,5
H_2S (Dreizucker-Eisen-Agar)	+	91,6 *

Zeichenerklärung:

% pos.: Anteil der positiven Reaktionen

* : in 0,8 % aller Fälle verzögert

2.1.3.1 Biochemisches Verhalten gegenüber Lactose

Als eines der fundamentalen Kriterien zur Unterscheidung der Salmonellen der Subgenera I, II und IV von Keimen wie S. arizonae (Subgenus III) oder Coliformen gilt, daß sie Lactose nicht vergären. Aus den Angaben in Tabelle 3 geht aber hervor, daß der Anteil positiver Reaktionen in diesen drei Subgenera 0,8 % ausmachte, und somit dieses Kriterium nicht absolut ist. Berichte über Lactose-vergärende Salmonellen lassen sich bis an den Beginn dieses Jahrhunderts zurückverfolgen (s. Tab. 4).

Die Angaben in der Literatur sprechen also insgesamt dafür, daß lactose-positive Varianten bei einigen Serovaren relativ häufig auftreten und dies auch insbesondere in Verbindung mit Trockenmilchprodukten (MARTH, 1969; POELMA und ROMERO, 1971). BLACKBURN und ELLIS (1973),

Tabelle 4: Literaturangaben über das Auftreten verschiedener lactose-positiver Salmonella-Serovaren

Autor(en)	Serovar
TWORT (1907)	S. typhi
KAUFFMANN (1937)	S. anatum
SELIGMANN und SAPHRA (1946)	S. newington
SAPHRA und SELIGMANN (1947)	S. newington
KRISTENSEN (1955)	S. paratyphi, S. typhimurium
McCOY (1962)	S. ferlac
KUNZ und EWING (1965)	S. typhi
BULMASH et al. (1965)	S. tennessee
GONZALES (1966)	S. tennessee
MARTH (1969)	S. newington
POELMA und ROMERO (1971)	S. anatum, S. newington, S. tennessee, S. schwarzengrund
RAY et al. (1971c)	S. cubana
HUHTANEN und NAGHSKY (1972)	verschiedene Stämme
FALCAO et al. (1975)	S. typhimurium
FERNANDES De TOLEDO et al. (1979)	S. typhimurium

die 552 aus Trockenmilchprodukten bzw. -Produktionsanlagen isolierte Salmonellen untersuchten, fanden 86 (15,6 %) Lactose-fermentierende Stämme, die alle als den Serovaren S. anatum, S. tennessee und S. newington zugehörig identifiziert werden konnten.

Die Gründe für die Abweichung einiger Salmonellenstämme in ihrem Verhalten gegenüber der Lactose konnten nach der Entdeckung der Plasmide zu Beginn der fünfziger Jahre (NOVICK, 1981) dargestellt werden. Es zeigte sich nämlich, daß bei vielen typischen und untypischen Lactose-fermentierenden Enterobacteriaceae Plasmide die genetische Informa-

tion für Enzyme des Kohlenhydratstoffwechsels tragen (HARWOOD, 1980). Damit können, ähnlich wie bei Antibiotikaresistenzen, solche Informationen potentiell von einer Bakterienart oder -gattung auf eine andere übertragen werden (BARON et al., 1959; FALKOW und BARON, 1962; EASTERLING et al., 1969; SYNENKI et al., 1973).

GUISO und ULLMANN (1976) stellten bei ihren Untersuchungen fest, daß es sich bei den durch Plasmide genetisch festgelegten Enzymen für den Lactoseabbau um ß-Galactosidase und Galactosid-Permease handelt. Da sich die Enzyme unabhängig davon, ob durch das Plasmid selbst oder durch das Lactose-Operon von E. coli kodiert (letzteres speichert die Information für noch ein weiteres Enzym), in bezug auf ihre Eigenschaften und ihre Induktion sehr ähnlich waren, schlossen die Autoren, daß die Information des Lactose-Operons von E. coli sich als Plasmid unter den Enterobacteriaceae verbreitet hat. Allerdings blieb diese These nicht unangefochten (CORNELIS et al., 1978). Daß durch Plasmide nicht nur die Fähigkeit zur Lactose-, sondern auch zur Saccharosespaltung übertragen werden kann, beschrieben WOHLHIETER et al. (1975) und JOHNSON et al. (1976). Letzteren gelang es z.B., von einem lactosepositiven S. tennessee-Stamm auf einen lactosenegativen E. coli-Stamm ein Plasmid zu übertragen, das nicht nur die genetische Information zur Lactose-, sondern auch zur Saccharosevergärung trug.

2.1.3.2 Nachweis lactosepositiver Varianten

Die praktische Bedeutung des Vorkommens lactosepositiver Salmonellen für die Lebensmittelkontrolle ist darin zu sehen, daß sie mit den gebräuchlichen Untersuchungsmethoden i.d.R. nicht erfaßt werden. So enthalten die meisten Selektivnährböden für Salmonellen Lactose (in manchen Fällen zusammen mit Saccharose) und einen Indikator (häufig Phenolrot), der über Farbumschlag eine Säurebildung anzeigt. Da solche Reaktionen für Salmonellen als untypisch gelten, entgehen lactosepositive Stämme zumeist dem Nachweis. Dies gilt natürlich ebenso für einen Großteil der Stämme von S. arizonae, da diese Keime zu 61,3 % (EDWARDS und EWING, 1972) Lactose vergären.

Um den Verbraucher vor einem durch lactosepositive Salmonellen bedingten gesundheitlichen Risiko zu schützen, sollte - insbesondere auch bei Trockenmilchprodukten - eine Untersuchungsmethodik gewählt werden, die falsch-negative Ergebnisse weitgehend ausschließt. (Siehe auch die zur Veröffentlichung anstehende DIN-Norm 10 181 "Nachweis von Salmonellen, Referenzverfahren für Milch und Milchprodukte"). Folgende Möglichkeiten bieten sich hierfür an: Einsatz eines nicht allein bzw. überhaupt nicht das Verhalten gegenüber Lactose anzeigenden Selektivmediums, wie Wismut-Sulfit-Agar (WILSON und BLAIR, 1972; WILSON, 1938) oder Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (TAYLOR, 1965) bzw. Überprüfung und Identifizierung einiger lactosepositiver Kolonien mit Hilfe eines Suchtests (z.B. mit Lysin-Eisen-Agar).

Die differenzierende Wirkung des Wismut-Sulfit-Agars beruht auf der Reduzierung von Sulfit zu Sulfid und Bildung von Eisensulfid in Gegenwart eines verwertbaren Kohlenhydrates (Glucose) und der Reduktion von Wismutionen zu metallischem Wismut durch Salmonellen (schwarze, metallisch-glänzende Kolonien). Der Nährboden wird häufig zum Nachweis von Salmonellen empfohlen (THATCHER und CLARK, 1968; POELMA et al., 1969; NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE - NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1971; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 1972; POELMA und SILLIKER, 1976) und von mehreren Untersuchern als anderen festen Salmonella-Nachweismedien überlegen bezeichnet (BYRNE et al., 1955; GABIS und SILLIKER, 1977; ANDREWS et al., 1977, 1979; MÜLLER, 1980). Andererseits sind in der Literatur aber auch gegenteilige Aussagen zu finden (TAYLOR et al., 1958; MONTFORD und THATCHER, 1961; YAMAMOTO et al., 1961; McCOY, 1962; COX et al., 1972b; ERDMAN, 1974; HARVEY und PRICE, 1975; D'AOUST et al., 1980a). Als Nachteile wurden z.B. genannt: mangelnde Selektivität und Elektivität, aber auch starke Hemmwirkung auf viele Salmonella-Serovaren. Diese Hemmwirkung verliert sich nach Angaben von McCOY (1962) aber nach einer vier- bis fünftägigen Lagerung der gegossenen Platten im Kühlschrank. Durch

diese Lagerung wie auch eine Aufbewahrung von bis zu zwei Tagen bei Zimmertemperatur kommt es zu keinem Verlust der selektiven Wirkung gegenüber unerwünschten Keimen (D'AOUST, 1977).

Da die alleinige Verwendung des Wismut-Sulfit-Agars für den Salmonellennachweis also nicht unproblematisch zu sein scheint, sollte daneben stets ein anderer geeigneter Selektiv-Agar mitgeführt werden. DIN 10 181 zur Untersuchung von Milch und Milchprodukten auf Salmonellen (Referenzverfahren) schreibt hierfür grundsätzlich Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose-Agar vor.

Der Xylose-Lysin-Desoxycholat-Agar (XLD) nach TAYLOR (1965) enthält Xylose und Lysin, die von Salmonellen abgebaut bzw. decarboxyliert werden. Der durch die Entstehung des Cadaverin bedingte pH-Wertanstieg wird durch Umschlag des Farbindikators Phenolrot nach purpurrot angezeigt. Desoxycholat soll andere Keime unterdrücken und das Schwärmen von Proteus verhindern (FAGERBERG und AVENS, 1976). Die Schwefelwasserstoffbildung wird durch Ausfällung schwarzen Eisensulfids in den Kolonien sichtbar gemacht. Typisch für Salmonellen sind transparente, die Farbe des Nährbodens aufweisende Kolonien mit u. U. schwarzem Zentrum. Allgemein soll der XLD-Agar zur Isolierung von Salmonellen gut brauchbar sein, wie aus der von FAGERBERG und AVENS (1976) gesichteten Literatur und Angaben von PIETZSCH (1981) hervorgeht. Es sind aber auch Hinweise zu finden, daß dieses Medium einzelne Salmonella-Serovaren hemmt (COX et al., 1972b) und hinsichtlich seiner Elektivität nicht optimal ist (FALCAO et al., 1975; CHAU und LEUNG, 1978). Auch für dieses Selektivmedium gilt also, daß zusätzlich ein anderer geeigneter Selektivagar eingesetzt werden sollte, um falsche Beurteilungen soweit wie möglich auszuschließen.

FALCAO et al. (1975) bedienten sich einer anderen Möglichkeit zur Identifizierung lactosepositiver Salmonellen, indem sie einen Suchtest entwickelten, basierend auf dem Lysin-Eisen-Agar nach EDWARDS und FIFE (1961) bzw. einem Pepton-Eisen-Agar. Dazu werden mehrere ver-

dächtige Kolonien vom Selektivnährboden in einem dieser beiden Medien auf Schwärzung durch Schwefelwasserstoffbildung geprüft. Fällt dieser Test positiv aus, so schließen sich zusätzliche Tests an, da sonst falsch-positive Ergebnisse (z.B. Citrobacter freundii) nicht ausgeschlossen werden können.

2.2 Faktoren, die Wachstum und Überleben von Salmonellen beeinflussen

Salmonellen stellen - wie andere Mikroorganismen auch - im Hinblick auf Wachstum, Stoffwechsel etc. gewisse Anforderungen an das sie umgebende Milieu. Das Vorkommen von Salmonellen in Lebensmitteln hängt ab von:

- Ausgangskontamination
- spezifischen, dem Lebensmittel eigenen ("intrinsiken" Faktoren) (insbesondere chemische, physikalische und biologische Eigenschaften wie a_w, pH, Eh, Nährstoffe, natürlich vorkommende und zugesetzte Hemmstoffe sowie Struktur des Lebensmittels)
- Änderungen durch Be- und Verarbeitung (speziell Wärmebehandlung, Säuerung); Sekundärkontamination
- äußeren ("extrinsiken") Einflüssen, die sich vor allem aus den Lagerungs- und Distributionsbedingungen ergeben (z.B. Temperatur, Feuchtigkeit, partieller Sauerstoffdruck)
- Wechselbeziehungen (Synergismus und Antagonismus) zwischen den verschiedenen, durch die vorher genannten Einflüsse selektierten Mikroorganismen (= sog. "Implizit-Parameter") (MOSSEL, 1977).

Auf den Einfluß der besonders wichtigen Parameter pH-Wert, Temperatur und Wasseraktivität soll im folgenden kurz eingegangen werden.

2.2.1 pH-Wert

Salmonellen sind im pH-Wert-Bereich zwischen 4,0 und 9,0 lebensfähig; bei niedrigeren und höheren Werten sterben sie langsam ab (BRYAN et al., 1979). CHUNG und GOEPFERT (1970) sowie MÜLLER (1979a) hatten

sogar noch eine Vermehrung von Salmonellen bei pH 4,05 und pH 4,1 registriert. Untersuchungen von GOVERD et al. (1979) ist zu entnehmen, daß Salmonellen bei pH-Werten unter 3,4 für 2 Tage, bei Werten zwischen 3,4 und 3,6 für 6 Tage und bei Werten über 3,6 für mehr als 30 Tage bei einer Temperatur von 22°C überlebten. Optimal für das Wachstum von Salmonellen ist nach LITCHFIELD (1973) der Bereich zwischen 6,0 und 8,0, nach CHUNG und GOEPFERT (1970) sowie BRYAN et al. (1979) der zwischen 6,5 und 7,5.

Zwischen den Salmonella-Serovaren können Unterschiede bezüglich des Wachstum ermöglichenden pH-Wert-Bereichs bestehen (STOKES und BAYNE, 1957; CORLETT und BROWN, 1980). CORLETT und BROWN (1980) geben z.B. als untere und obere Grenze für S. paratyphi 4,5 bis 7,8 an, für S. schottmuelleri 4,5 bis 8,0 und für S. typhi 4,0 bis 9,6. Andererseits fanden COX et al. (1972a) bei den Serovaren S. senftenberg, S. thompson und S. typhimurium bei pH-Werten zwischen 2,6 und 6,3 und Temperaturen von 40°C keine wesentlichen Unterschiede.

2.2.2 Temperatur

Bei Temperaturen zwischen 5 und 47°C können sich die meisten Salmonellen in Nährmedien und Lebensmitteln vermehren, optimal bei 37°C (LITCHFIELD, 1973; BRYAN et al., 1979). Die Temperatur, bei der die höchste Toleranz gegenüber einer hohen Wasserstoffionenkonzentration gegeben war, lag etwas niedriger, und zwar zwischen 25 und 32°C (CHUNG und GOEPFERT, 1970).

ELLIOTT und HEINIGER (1965), die an 34 Salmonellen-Stämmen die maximales Wachstum erlaubende Temperatur in einem festen Trypton-Soya-Medium prüften, fanden bei 48 Std. Inkubation maximale Wachstumstemperaturen zwischen 43,2 (einige Stämme von S. gallinarum) und 46,2°C (S. senftenberg 775W). Bei Temperaturen von 50°C überlebte kein Stamm. Bezüglich der minimalen Wachstumstemperatur ist zu berücksichtigen, daß dieser Grenzwert wesentlich vom pH-Wert des Mediums beeinflußt wird (CHUNG und GOEPFERT, 1970; MATCHES und LISTON, 1971;

LITCHFIELD, 1973). So trat bei einem pH-Wert von 6,2 eine Wachstumshemmung erst bei 5,6°C ein, bei einem pH-Wert von 5,6 dagegen bereits bei 10°C (LITCHFIELD, 1973). Dabei können offensichtlich auch Unterschiede zwischen den Salmonella-Serovaren bestehen (MATCHES und LISTON, 1971).

Die Angabe von BOMAR und HAJEK (1977), daß es noch bei Temperaturen von 1°C zu einer Vermehrung von Salmonellen gekommen sein soll, ist außergewöhnlich (SINELL und SIEMS, 1978). Die letztgenannten Autoren verwiesen darauf, daß es bei dieser Temperatur eher zu einer Reduktion der Salmonellen kommt und vermuten, daß es sich bei den "Salmonellen" um psychrotrophe Enterobacteriaceae gehandelt habe. Dies wurde dann auch von BOMAR (1978) nach einer Überprüfung der Untersuchungsmethodik zugestanden.

Die bei der Pasteurisierung von Milch zur Anwendung kommende Temperatur-Zeit-Kombination überleben Salmonellen in der Regel nicht (KÄSTLI, 1957; SCHROEDER, 1967 und TAYLOR, 1969). Bei der Herstellung von Sprühtrockenmilch können infolge einer Rekontamination nach der Pasteurisierung, z.B. über die Luft (HELDMAN et al., 1968; LACHAPELLE, 1979), in die erhitzte Milch hineingelangte Salmonellen aber ein Problem darstellen. Im Sprühtrockner werden zwar häufig Temperaturen von etwa 200°C (CHRISTIAN, 1980) erreicht, doch ist nicht die Ausgangstemperatur, sondern die auf die Keime in den Partikeln einwirkende Temperatur entscheidend für den Grad der Abtötung. So berichtete PIETZSCH (1978) über das Auftreten von Salmonellen in einer Instant-Kindertrockennahrung, die für 2 bis 3 Sekunden bei 180 - 200°C Zuluft-Temperatur im Sprühtrockner versprüht worden war. Dies dürfte darauf zurückzuführen sein, daß im Inneren eines mit einer Ausgangstemperatur von 180°C und einer Endtemperatur von 90°C versprühten Tröpfchens nur Temperaturen von 65 bis 70°C herrschen, welche Salmonellen für kurze Zeit tolerieren können (ESCHMANN, 1970). Die Stärke des Temperaturabfalls wird dabei wesentlich von Konsistenz des versprühten Materials, Dichte der einzelnen Partikel, deren Durchmesser und deren "Kruste" (ein

kleiner dünnwandiger Partikel erlaubt eine höhere Temperatur im Inneren als ein großer dickwandiger) bestimmt (LiCARI und POTTER, 1970b, d; MILLER et al., 1972).

2.2.3 Wasseraktivität

Unter Wasseraktivität (ausgedrückt als a_w-Wert) wird der Anteil des Wassers in einem Lebensmittel verstanden, der nicht durch lösliche Substanzen (Salze, Proteine, Kohlenhydrate) gebunden ist und somit dem Mikroorganismus zur Verfügung steht (LEISTNER und RÖDEL, 1976). Er ist definiert als das Verhältnis der Wasserdampfspannung über einem Lebensmittel zum Partialdruck reinen Wassers bei gleicher Temperatur (MOSSEL, 1977) und kann mit geeigneten Meßgeräten (z.B. Hygrometer) bestimmt werden (TROLLER und CHRISTIAN, 1978).

Wachstum, Morphologie, Beweglichkeit und Stoffwechselaktivität von Mikroorganismen sind von der Wasseraktivität abhängig (TROLLER, 1980). Sinkt die Wasseraktivität, so werden die in dem Milieu enthaltenen Keime einem starken osmotischen Druck ausgesetzt. Die Bakterienzelle verliert aufgrund der veränderten osmotischen Verhältnisse Wasser. Damit steigt aber die intrazelluläre K^+-Konzentration und aktiviert die enzymatische Bildung von Glutamat. Über das Glutamat wird Wasser in die Zelle zurückgezogen, es kommt zur Wiederherstellung des normalen Turgors, und Wachstum, allerdings aufgrund des erheblichen Energieaufwands auf einem niedrigeren Niveau, tritt wieder auf. Diesem Regelmechanismus sind aber dadurch Grenzen gesetzt, daß Glutamat zum Ausgleich seiner negativen Ladung ein Kation, meist K^+, benötigt, welches in höheren Konzentrationen Enzymfunktionen beeinträchtigt. Viele grampositive Keime besitzen nun die Möglichkeit, Glutamat zu Prolin umzubauen, eine Aminosäure, die aufgrund ihrer Ladungsverhältnisse keine Anwesenheit eines Kations voraussetzt. Solche Bakterien können dann auch noch bei niedrigeren a_w-Werten wachsen (MEASURES, 1975), Staph. aureus z.B. bei 0,8 (MOSSEL, 1975a). Gramnegative Keime, die über diesen Mechanismus nicht verfügen, stellen demgegenüber ihre Lebens-

äußerungen bereits bei relativ hohen a_w-Werten ein. So nennen GENIGEORGIS und RIEMANN (1979) für Salmonellen in flüssigen Medien einen Wachstumsbereich zwischen a_w-Werten von 0,999 und 0,945. Nicht bewegliche Salmonellen sollen in einem engeren Bereich und auch langsamer wachsen (CHRISTIAN und SCOTT, 1953). Zu ähnlichen Resultaten war auch CAMPANINI (1978) gekommen, der Wachstum und Überleben von 6 Salmonella-Stämmen in Nährmedien bei sinkenden a_w-Werten und Temperaturen von 30°C über etwa 60 Tage untersucht hatte. Dabei konnte er sogar noch Wachstum in Wasseraktivitätsbereichen von 0,945 bis 0,934 beobachten. CHRISTIAN und SCOTT (1953), die das Wachstum von S. oranienburg in Trockenmilch und anderen Lebensmitteln bei verschiedenen a_w-Werten prüften, konnten in rehydrierter Trockenmilch Wachstum ab einem a_w-Wert von 0,94 registrieren. Bei einem Wasseraktivitätswert von 0,92 konnte auch nach 21tägiger Bebrütung keine Vermehrung mehr festgestellt werden. Diese Angaben stimmen mit denen von GENIGEORGIS und RIEMANN (1979) überein, deren Ergebnissen zufolge bewegliche Salmonellen sich in Lebensmitteln ab einem a_w-Wert von 0,930 vermehren.

Schon seit längerem ist bekannt, daß zwischen der Wasseraktivität und der Hitzeresistenz eines Keimes Abhängigkeiten bestehen. So gilt allgemein die Regel, daß bei niedrigerem a_w-Wert die Hitzeresistenz stärker ausgeprägt ist (SPERBER, 1981). Eine Korrelation zwischen den beiden Parametern aufzustellen, gelang allerdings nicht (GOEPFERT et al., 1970). Hierfür scheinen mindestens zwei Faktoren verantwortlich zu sein, nämlich Unterschiede innerhalb der einzelnen Salmonella-Stämme selbst und Unterschiede in der Zusammensetzung des Mediums. So galt z.B. S. senftenberg 775W seit den Untersuchungen von NG et al. (1969) als besonders hitzeresistent. Die Autoren ermittelten für sie in einem Medium mit hoher Wasseraktivität einen $D_{57°C}$ von 31,0 min, während andere Stämme nur solche von ca. einer min aufwiesen. DOESBURG et al. (1970) konnten andererseits bei Versuchen mit Material niedrigen a_w-Wertes keine höhere Hitzeresistenz von S. senftenberg 775W feststellen.

Eine Erklärung für diese gegensätzlichen Resultate ist der Hinweis von GOEPFERT et al. (1970), daß mit sinkendem a_w-Wert alle anderen von ihnen getesteten Serovaren einen stärkeren Anstieg ihrer Hitzeresistenz zeigten als S. senftenberg 775W. Der Einfluß des a_w-Wertes auf die Hitzeresistenz einzelner Salmonella-Serovaren wird auch daraus ersichtlich, daß sich die $D_{60°C}$ verschiedener Serovaren in Magermilch nicht wesentlich unterschieden, gegenüber der Sprühtrocknung aber S.tennessee bedeutend resistenter war als die übrigen Serovaren (LiCARI und POTTER, 1970b, d). Den Arbeiten von GOEPFERT et al. (1970), BAIRD-PARKER et al. (1970) und GIBSON (1973) ist darüber hinaus zu entnehmen, daß die Komponenten des Mediums insofern von erheblicher Bedeutung sind, als z.B. die Erniedrigung der Wasseraktivität mit Saccharose eine stärker protektive Wirkung hatte als die mit anderen Stoffen. Die Ursache für den Anstieg der Hitzeresistenz bei sinkendem a_w-Wert ist noch ungeklärt. CORRY (1975) spricht die Möglichkeit an, daß die Dehydratation der Bakterienzelle bei Wasseraktivitätserniedrigung einen Einfluß haben könnte.

2.2.4 Lagerung

Während der Lagerung mit Mikroorganismen kontaminierter Lebensmittel kann es zu einer Vermehrung oder Abnahme des Keimgehaltes kommen. Bei Trockenmilchprodukten stirbt ein hoher Prozentsatz der in dem produktionsfrischen Erzeugnis enthaltenen Keime mehr oder minder schnell ab, und zwar je nach Art der Flora und in Abhängigkeit von Art und Beschaffenheit des Produktes (Zusammensetzung, Wasseraktivität) sowie der Lagerungstemperatur.

Die Bedeutung der Wasseraktivität des Produktes für das Überleben von Salmonellen wird aus den Publikationen von CHRISTIAN und STEWARD (1973), BRYAN et al. (1979) sowie CHRISTIAN (1980) ersichtlich. Danach überleben Salmonellen über lange Zeit bei a_w-Werten unter 0,20 (BRYAN et al., 1979) bzw. 0,22 (CHRISTIAN und STEWARD, 1973), selbst wenn pH-Wert und Temperatur des Mediums ungünstig liegen. Bei höheren a_w-Werten war die Absterberate in niedrigen pH-Bereichen größer.

Auf den Einfluß der Produktart auf das Überleben der Salmonellen wiesen z.B. RAY et al. (1971d), PEARCE (1979) sowie TERPLAN (1980) hin. So konnte PEARCE (1979) in fast 2 Jahre lang bei Zimmertemperatur gelagertem Casein keine Veränderung im Grad der Kontamination mit Salmonellen feststellen. TERPLAN (1980) berichtete, daß aus Caseinat noch nach mehreren Jahren Salmonellen isoliert werden konnten, in einem zuckerhaltigen, für die Herstellung eines Milchmixgetränkes bestimmten Produkt aber bereits nach zwei Wochen keine Salmonellen mehr nachweisbar waren.

Während die Salmonellen in Trockenmilchprodukten bei höheren Lagerungstemperaturen (über 40°C) offensichtlich relativ schnell absterben, überleben sie bei niedrigeren Temperaturen länger. So beobachteten z.B. McDONOUGH und HARGROVE (1968), die künstlich mit Salmonellen kontaminiertes Magermilchpulver bei Temperaturen zwischen 4,4 und 50°C lagerten, daß bei 43,3 und 50°C nach 6 Wochen nur noch einzelne und nach 15 Wochen keine Salmonellen mehr nachweisbar waren. Bei 15,5°C zeigten sich dagegen in diesem Zeitraum nur unwesentliche Veränderungen des Salmonellagehaltes. Zu ähnlichen Resultaten kamen auch LiCARI und POTTER (1970c), die feststellten, daß der Salmonellagehalt in Temperaturbereichen von 45 bis 55°C nach 4 bis 8 Wochen um 3 und mehr Zehnerpotenzen abgenommen hatte, bei 25 oder 35°C die Salmonella-Reduzierung aber erheblich langsamer vonstatten ging. Dabei zeigten - wie von RAY et al. (1971d) bestätigt wurde - die Serovaren unterschiedliche Resistenzen (S. thompson war z.B. widerstandsfähiger als S. typhimurium). Der Zeitpunkt der Kontamination (vor oder nach dem Sprühtrocknen) war ohne Einfluß auf die Resistenz, während die Art der Herstellung sowie die Ausgangskeimzahl von Bedeutung zu sein schienen (RAY et al., 1971d). Auffällig war, daß das Absterben der Salmonellen nicht kontinuierlich vor sich ging, sondern in zwei Schritten, nämlich in den ersten zwei Wochen sehr rasch, dann langsamer (LiCARI und POTTER, 1970c; RAY et al., 1971d).

Auch wenn durch Lagerung bei hohen Temperaturen der Kontaminations-

grad merklich verringert werden kann, so treten doch gleichzeitig erhebliche Minderungen der Qualität des Produktes auf (LiCARI und POTTER, 1970c; RAY et al., 1971d; PEARCE, 1979). Darüber hinaus bietet eine derartige Lagerung keine Gewähr, daß die Salmonellen innerhalb eines begrenzten Zeitraumes vollständig verschwunden sind. RAY et al. (1971d) konnten noch nach einem Jahr Salmonellen aus derartigen Proben nachweisen. Die Einhaltung guter hygienischer Bedingungen bei der Herstellung von Trockenmilch (good manufacturing practice) kann also nicht durch anschließende Lagerung des Produkts bei erhöhter Temperatur ersetzt und umgangen werden.

2.3 Natürlicher Lebensraum und Reservoire von Salmonellen und ihre Verbreitung über Lebens- und Futtermittel

Salmonellen sind zum größten Teil nicht wirtspezifisch (eine Ausnahme bildet z.B. die stark an den Menschen adaptierte S. typhi (DRÄGER, 1971)) und ubiquitär verbreitet. Sie bewohnen natürlicherweise den Darmtrakt von Warm- und Kaltblütern (FAGERBERG und AVENS, 1976; BRYAN et al., 1979). Unter letzteren spielen die Reptilien für den Salmonellen-Infektions-Zyklus eine besondere Rolle, da sie die höchste Befallsquote von allen Wildtieren aufweisen, das breiteste Spektrum an Serovaren beherbergen, selber nicht erkranken und nach einmaliger Aufnahme von Salmonellen lebenslange Ausscheider bleiben (MÜLLER, 1979b).

Die Verbreitung der Keime erfolgt in erster Linie durch fäkale Kontamination von Futter- und Lebensmitteln (BRYAN et al., 1979; MÜLLER, 1979b). YOSHIMURA et al. (1979) konnten z.B. aus 24,8 % von 306 Tiermehlen insgesamt 41 Serovaren isolieren, KEMPF und PIETZSCH (1981) aus 26,8 % von 153 Tierkörpermehlproben 23 Serovaren. Bei den als Vektor dienenden Lebensmitteln handelt es sich überwiegend um solche tierischen Ursprungs. Fleisch einschließlich Geflügel war z.B. bei 500 Salmonelloseausbrüchen in den USA während der Jahre 1966 bis 1975 mit 30 % die wichtigste Infektionsquelle für den Menschen (SILLIKER, 1980). Auffällig verbessert hat sich die Situation in bezug auf Eier und Eipro-

dukte. Waren in den Jahren 1963 bis 1966 noch 34,1 % aller Ausbrüche in den USA durch diese Lebensmittel verursacht (BRYAN, 1968), so sank ihr Anteil in den Jahren von 1966 bis 1975 auf 6 %, nach SILLIKER (1980) ein Erfolg der Kontrollmaßnahmen. Häufig werden Salmonellosen auch ausgelöst durch importierte Lebensmittel (SEELIGER und MAYA, 1964) oder neue bzw. mit neuen Produktionsverfahren hergestellte Lebensmittel (BRYAN et al., 1979). Ein typisches Beispiel hierfür sind die 1965/66 in den USA durch Instant-Magermilchpulver hervorgerufenen Salmonellosen (COLLINS et al., 1968), auf die später noch ausführlicher eingegangen wird.

Bei den über Futter- und Lebensmittel verbreiteten Salmonellen unterscheidet MOSSEL (1977) zwei Gruppen: Serovaren, die immer wieder in Ausbrüche verwickelt sind und dementsprechend den Hauptteil aller isolierten Stämme ausmachen (z.B. S. typhimurium, S. panama, S. stanley), und Serovaren, die nur sporadisch auftauchen und über die Infektkette importiertes Futtermittel - Schlachttier - Lebensmittel beim Menschen schließlich zu einer Lebensmittelvergiftung führen (WINKLE und ROHDE, 1979). Das besonders häufige Auftreten der ersten Gruppe führt MOSSEL (1977) auf deren bessere Überlebensfähigkeit in Wasser und Abwässern und anderen Umweltnischen zurück.

Neben den oben angeführten gibt es auch weniger beachtete, aber nicht minder bedeutsame Infektionsquellen für den Menschen. So wurde in den USA nachgewiesen, daß etwa 15 % aller Salmonellosen über als Haustiere gehaltene Reptilien verursacht werden (MÜLLER, 1979b).

2.4 Salmonellen als Ursache von Lebensmittelvergiftungen

2.4.1 Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen

Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen haben trotz verbesserter Lebensmittelhygiene und intensivierter Forschung auf diesem Gebiet international stark zugenommen. LEMME (1980) nennt hierfür folgende Gründe:

- Wanderungs- und Flüchtlingsbewegungen in großem Ausmaß (Wander-

arbeiter / Gastarbeiter, Flüchtlingsströme);

- Zunahme der Gemeinschaftsverpflegung;
- neue Techniken in Produktion, Verarbeitung, Vertrieb, Lagerung und Transport von Lebensmitteln;
- Beibehaltung hygienisch bedenklicher Verzehrsgewohnheiten;
- Zunahme der allgemeinen Umweltverschmutzung.

Unter den Erregern von Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen stehen i.d.R. die Salmonellen an der Spitze. Eine Ausnahmestellung nimmt Japan ein. Hier führten in den Jahren 1968 bis 1972 die durch Vibrio parahaemolyticus hervorgerufenen Ausbrüche die Liste der insgesamt registrierten mikrobiell bedingten und durch Lebensmittel ausgelösten Erkrankungen mit einem Anteil von 52,2 % an, gefolgt von Staph.aureus mit 27,6 % und Salmonellen mit 12,8 % (TODD, 1978). Einen Überblick über die drei in angelsächsischen Ländern bzw. in der BRD am häufigsten in den letzten Jahren isolierten Erreger lebensmittelbedingter Erkrankungen geben die Tabellen 5, 6 und 7.

Tabelle 5: Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen mikrobiellen Ursprungs in den USA während der Jahre 1973-1977 (nach U.S. DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION, AND WELFARE, 1976, 1979)

Ursache	Anzahl d. Ausbrüche (Anzahl d. Einzelerkrankungen)				
	1973	1974	1975	1976	1977
Cl. perfringens	9 (1424)	15 (863)	16 (419)	6 (509)	6 (568)
Salmonellen	33 (2462)	35 (5499)	38 (1573)	28 (1169)	41 (1706)
Staphylokokken	20 (1272)	43 (1565)	45 (2275)	26 (930)	25 (905)
Gesamtzahl der bakteriell bedingten LMV	84 (6835)	122 (8551)	123 (5031)	92 (3270)	101 (3454)

Tabelle 6: Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen mikrobiellen Ursprungs in Kanada, England/Wales und Australien (nach TODD, 1978)

Ursache	Anzahl der Ausbrüche (Anzahl d. Einzelerkrankungen)		
	Kanada 1973-1975	England/Wales 1973 - 1975	Australien 1967 - 1971
Cl. perfringens	22 (1291)	150 (6489)	11 (-) x)
Salmonellen	58 (2248)	1685 (21428)	9 (-) x)
Staphylokokken	80 (1526)	50 (714)	9 (-) x)
Gesamtzahl der bakteriell bedingten LMV	199 (5467)	1946 (28 758)	33 (-) x)

x keine Angaben

Tabelle 7: Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen mikrobiellen Ursprungs in der Bundesrepublik Deutschland und Berlin (West) 1968 bis 1978 nach Literaturangaben (nach SINELL und KOLB, 1980)

Ursache	Anzahl der Ausbrüche	(Anzahl der Erkrankungen)
Cl. perfringens	3	(959)
Salmonellen	182	(8451)
Staphylokokken	23	(2165)
Gesamtzahl der bakteriell bedingten LMV	229	(12 268)

In der BRD ist also mit Abstand am häufigsten über Salmonellen als bakterielle Lebensmittelvergifter berichtet worden.

Alle statistischen Angaben dieser Art können jedoch aus verschiedenen, im folgenden aufgeführten Gründen ein verzerrtes Bild der tatsächlichen Lage widerspiegeln:

- Nur wenige Länder, in denen Meldepflicht - wie z.B. in den Ostblockstaaten (SINELL und KOLB, 1980) - besteht, verfügen über zentrale Sammelstellen für derartige Hinweise, die alle gemeldeten Lebensmittelvergiftungen erfassen. In anderen Ländern, wie Großbritannien und Kanada, bestehen nur freiwillige Meldesysteme (LEMME, 1980). In den USA werden freiwillige Angaben über Lebensmittelvergiftungen beim Center for Disease Control in Atlanta gesammelt und jährlich veröffentlicht. In der Bundesrepublik Deutschland waren schließlich bis zum 18.12.1979 (Novelle zum BSeuchG) nur Salmonellosen und Botulismus, nicht aber sonstige Lebensmittelvergiftungen meldepflichtig (SINELL und KOLB, 1980).

- Nur ein geringer Anteil aller Erkrankungen wird bekannt. So schätzt MOSSEL (1977), daß überhaupt nur 1 bis 5 % der Lebensmittelvergiftungen gemeldet werden. Insbesondere Lebensmittelintoxikationen, wie durch Staph.aureus, laufen im allgemeinen sehr rasch und wenig dramatisch ab, so daß sie nur dann zur Meldung kommen, wenn sie im Verlauf größerer Ausbrüche registriert werden (SINELL und KOLB, 1980). Nach YOSHIKAWA et al. (1980) liegt aber sogar die Dunkelziffer der Salmonellosen in den USA bei 99 %.

- Der Anteil der Lebensmittelvergiftungen unbekannter Ätiologie ist relativ groß. Nach TODD (1978) war z.B. von 1973 bis 1975 in Kanada bei 84% und in den USA bei 61,7 % aller Ausbrüche die Ursache unbekannt. Auch in Japan und Australien machten diese durch den Verzehr von Lebensmitteln ausgelösten Erkrankungen ein Drittel aller Ausbrüche der Jahre 1968 bis 1972 bzw. 1967 bis 1971 aus (TODD, 1978).

2.4.2 Anteil der durch Milch und Milchprodukte hervorgerufenen Salmonellosen an deren Gesamtzahl

Der Anteil durch Milch und Milchprodukte hervorgerufener Salmonellosen ist im Vergleich zu anderen Lebensmitteln sehr gering; in den USA waren sie z.B. nach SILLIKER (1980) an 500 Ausbrüchen während der Jahre 1966 bis 1975 mit 4 % beteiligt, in Kanada zwischen 1973 und 1975

sogar nur mit 2,5 % (TODD, 1978). Ähnliches gilt auch für die Bundesrepublik Deutschland: PÖHN (1979) erwähnte für 1976 insgesamt 1479 Salmonella-Erstisolierungen, wobei als vermutliche Infektionsquellen Milch (42 Fälle) und Milchprodukte (66 Fälle) mit 7,3 % partizipierten; bei 1064 Erstisolierungen im Jahre 1977 machte ihr Anteil nur noch 2,3 % aus (Milch 2 Fälle, Milchprodukte 22 Fälle) (PÖHN, 1980). In England und Wales waren in den Jahren 1941 bis 1972 1032 Salmonellosausbrüche zu verzeichnen, wovon 86 auf den Genuß von Milch, in erster Linie Rohmilch, zurückgeführt werden konnten (McCOY, 1975).

2.4.3 Durch Trockenmilchprodukte bedingte Salmonellosen

Der Übersicht von MARTH (1969) über das Auftreten von Salmonellen in Milch und Milchprodukten und durch sie hervorgerufene Erkrankungen ist zu entnehmen, daß bereits in den Jahren 1945 bis 1950 aus Bulgarien sowie 1950 und 1954 aus Großbritannien über Salmonellosen berichtet wurde, die durch mit S.typhimurium kontaminierte Trockenmilch ausgelöst worden waren. In den USA kam es in 17 Bundesstaaten von April 1965 bis Januar 1966 zu mehreren Erkrankungen, hervorgerufen durch S.newbrunswick in Trockenmagermilch (SCHROEDER, 1967; COLLINS et al., 1968). S.newbrunswick konnte auch bei Stufenkontrollen im Betrieb des Herstellers dieser Trockenmagermilch gefunden werden, ebenso im Luftfilter des Sprühtrockners und bei zwei im Siebe- und Abfüllraum beschäftigten Angestellten. Die Verteilung der positiven Produktproben bei einer Kontrolle an fünf aufeinanderfolgenden Tagen sprach für eine sporadische Kontamination des Produktes aus einer Quelle innerhalb der Anlage. Obwohl nicht herausgefunden wurde, wie die Salmonellen in den Betrieb gelangen konnten, lassen sich trotzdem wertvolle Hinweise aus den damals gemachten Untersuchungen ableiten, besonders in bezug auf die Schwachstellen einer solchen Anlage zur Herstellung von Trockenmilchprodukten. Als solche ungünstigen Punkte erwiesen sich in diesem Falle:

- Es wurde nicht kontrolliert, ob die Pasteurisierungstemperatur im

Plattenerhitzer erreicht bzw. gehalten wurde.

- Die Lufteinlässe für Sprühtrockner und Trockner nach der Instantisierung befanden sich in einem Siebe- und Abfüllraum, dessen Luft stark milchpulverhaltig war. Die Filter wurden häufig gewechselt, zum Teil sogar während des Betriebes der Anlage.
- Einige Stellen in der Produktionslinie waren einer Reinigung und Desinfektion schwer bzw. nicht zugänglich.

Bei darauf gezielt durchgeführten Untersuchungen wurden in 34 Trockenmagermilch- und 27 Umgebungsproben von 2741 im Zeitraum von April bis August 1966 in 156 Herstellerbetrieben gezogenen Proben Salmonellen nachgewiesen (MARTH, 1969). Von im ersten Halbjahr 1967 untersuchten 3315 Produkt- bzw. 1475 Umgebungsproben aus 200 Betrieben erwiesen sich 1 % bzw. 8,2 % als salmonellenhaltig. Eine abschließende Auswertung auch anderer hier nicht aufgeführter Untersuchungen zeigte, daß 0,2 % aller Proben mit Salmonellen kontaminiert gewesen waren und daß diese aus insgesamt 13 % der Betriebe stammten (MARTH, 1969).

Außer den auf S. newbrunswick zurückzuführenden Erkrankungen wurden in den USA auch Lebensmittelvergiftungen durch einen lactosepositiven Stamm von S. newington bzw. durch S. newport nach Genuß von rekonstituierter Trockenmagermilch ausgelöst (MARTH, 1969).

Im Jahre 1973 traten etwa 3000 Erkrankungen - hauptsächlich bei Kleinkindern - in Trinidad auf. Als infektiöses Agens konnte S. derby identifiziert werden, die über Trockenmilch verbreitet worden war. Wie deren Kontamination zustande gekommen war, konnte nicht sicher geklärt werden (WEISSMAN et al., 1977).

Von Sommer 1976 bis Frühjahr 1977 wurden auch in der BRD gehäuft Salmonellosen bei Kleinkindern beobachtet, für die zwei verschiedene Produkte und Serovaren verantwortlich waren. Zum einen wurde ein aus den Niederlanden eingeführtes Kalium-Kaseinat, aus dem man später S. panama isolierte, mit anderen Komponenten gemischt als Instant-Trockenheilnahrung in den Handel gebracht, so daß nach dem Genuß ins-

gesamt etwa 60 - 100 Kinder erkrankten (PIETZSCH, 1 978). Zum anderen konnte aus sprühgetrockneter Instant-Kindertrockennahrung S. newport isoliert werden. Die Anzahl der hierdurch ausgelösten Erkrankungen blieb unbekannt, doch konnte im Herstellungsbetrieb ein mit der Reinigung des Sprühturmes betrauter Mitarbeiter als Ausscheider von S. newport ermittelt werden. Möglicherweise gelangten die Salmonellen durch einen Riß in der Wand des Sprühturmes in dessen Inneres (PÖHN, 1977; PIETZSCH, 1978).

Die letzten Hinweise auf das Vorkommen von Salmonellen in Trockenmilchprodukten stammen von FURLONG et al. (1979), die über eine symptomatische und zwei unsymptomatische Salmonellosen berichteten, welche im Januar 1979 im US-Bundesstaat Oregon nach dem Genuß von Trockenmagermilch auftraten. Als Erreger konnten dabei S. typhimurium und S. agona isoliert werden.

2.4.4 Infektiöse Dosis

Bei den beiden erwähnten, durch Genuß von Heil- bzw. Kindertrockennahrung ausgelösten Salmonellosen in der BRD lag nur eine sehr geringe Kontamination der Produkte vor. So war von S. panama in 100 g des betreffenden Trockenprodukts nur ein Keim nachweisbar (PIETZSCH, 1978). Nach CRAVEN et al. (1975) genügten 1000 Salmonellen in kontaminierter Schokolade, um Erkrankungen hervorzurufen. GEORGE (1976) berichtete über eine infektiöse Dosis von 200 Salmonellen, und auch SILLIKER (1980) machte ähnliche Beobachtungen bei mehreren Ausbrüchen. Dies steht im Widerspruch zu Angaben, daß die infektiöse Dosis bei Salmonellen im Bereich von 10^6 bis 10^8 Keimen liegt, wie es bei Versuchen mit Freiwilligen zu Beginn der fünfziger Jahre in den USA ermittelt wurde (MÜLLER, 1979b). Es ist aber zu berücksichtigen, daß die infektiöse Dosis u.a. abhängt von Alter, Gesundheit, Ernährungszustand und Magenfunktion des betreffenden Menschen sowie Virulenz der jeweiligen Serovar (MÜLLER, 1979b; RUSCHKE, 1980).

2.4.5 Salmonellen-Toxine

Traditionell werden für die Symptome der Salmonellosen Endotoxine, also Protein-Lipoid-Polysaccharid-Komplexe der Zellwand gramnegativer Keime (BLOBEL und SCHLIESSER, 1979) verantwortlich gemacht (YOSHIKAWA et al., 1980). In neuerer Zeit konnten allerdings, ähnlich wie bei E. coli und Vibrio cholerae, Exo-Enterotoxine mit Proteincharakter nachgewiesen werden (KÜHN et al., 1978). Eine Revision der herkömmlichen Theorie über die Entstehung der Krankheit ist also möglich.

2.4.6 Enteritis infectiosa

Das Bundesseuchengesetz unterscheidet bezüglich der durch Salmonellen hervorgerufenen Erkrankungen zwischen Typhus, Paratyphus und Enteritis infectiosa. Damit ist den unterschiedlichen Krankheitsbildern (septikämische Allgemeininfektion mit besonderer Beteiligung des Darmes bei S. typhi und S. paratyphi bzw. enteritische Form bei den übrigen Salmonellen (HALLMANN und BURKHARDT, 1974)) Rechnung getragen. Einige Serovaren rufen allerdings auch - insbesondere bei Kindern - typhusähnliche Krankheitsbilder hervor. Die Enteritis infectiosa ist i.d.R. durch die in Tab. 8 aufgeführten Symptome gekennzeichnet.

Tabelle 8: Klinik der Enteritis infectiosa (nach BRYAN et al., 1979)

Inkubationszeit:	8 bis 72 h (meist 20 bis 48 h)
Symptome:	Diarrhoe (dünn-suppig bis blutiger Stuhl) in schweren Fällen mit Dehydratation, Abdominalkrämpfe, Übelkeit, Erbrechen und Fieber, meist im Bereich von 38 - 39°C
Krankheitsdauer:	2 bis 5 Tage
Ausscheider:	in 50 % der Erkrankungen für mehrere Wochen, selten bis zu sechs Monaten

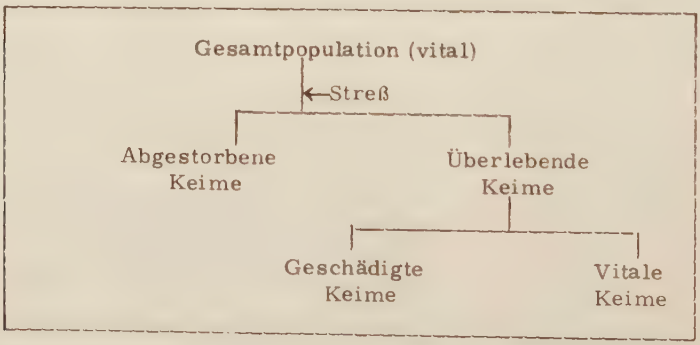
2.5 Aspekte des Nachweises von Salmonellen in Trockenmilchprodukten

Bei der Untersuchung von Trockenmilchprodukten auf Salmonellen ergeben sich einige Aspekte, die im Interesse des Verbraucherschutzes von Bedeutung sind. So muß grundsätzlich mit einer subletalen Schädigung eventuell vorhandener Keime gerechnet werden. Zum anderen sollten sowohl im Hinblick auf die Sicherheit des Konsumenten als auch im eigenen Interesse des Herstellers produktionsbegleitende Kontrollen durchgeführt werden, deren Grundlage geeignete Probenpläne bilden.

2.5.1 Subletale Schädigung von Salmonellen und ihr Einfluß auf den Nachweis

Wenn Salmonellen, wie auch andere Mikroorganismen, im Verlauf der Herstellung und Lagerung des Nahrungsmittels einem erheblichen Streß ausgesetzt werden, so werden sie - sofern sie überleben - zumeist subletal geschädigt (HURST, 1980). Dabei ist allerdings nicht die gesamte Mikroorganismenpopulation einheitlich betroffen (Tabelle 9).

Tabelle 9: Auswirkungen von Streß auf die Mikroorganismenpopulation eines Lebensmittels (nach RAY, 1979)



Viele chemische und physikalische Faktoren können eine solche Schädigung bewirken, z.B. hohe und niedrige Temperaturen, Trocknung, Strahlung, Säuerung, Konservierungsmittel, Antibiotika, ungünstige osmoti-

sche Verhältnisse (MOSSEL und CORRY, 1977; RAY, 1979). Die Streßfaktoren können unterschiedliche Zellbestandteile bzw. deren Synthese beeinflussen: Zellwand, Membranen, Proteine, RNA (Ribosomen) und DNA werden genannt (BUSTA, 1976; MOSSEL und CORRY, 1977). Im Zentrum des Geschehens steht aber wohl die Schädigung der Membranen (HURST, 1977). Die Auswirkungen auf Stoffwechsel und Wachstum einer Bakterienzelle sind in Tabelle 10 zusammengefaßt.

Tabelle 10: Mögliche Auswirkungen von Streß auf eine Bakterienzelle (nach RAY, 1979)

1. Erhöhte Empfindlichkeit gegen
   a) oberflächenaktive Substanzen
   b) Salze und toxische chemische Stoffe
   c) Antibiotika
   d) Farbstoffe
   e) Säuren und niedrige pH-Werte
2. Verlust von Zellinhaltsstoffen
3. Verlängerte Anlaufphase (lag-Phase)
4. Unfähigkeit der Vermehrung vor Wiederbelebung
5. Fähigkeit zur Wiederbelebung in einem geeigneten Milieu

Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt,daß einige Inhaltsstoffe von Nachweismedien, die ohne negativen Einfluß auf den Stoffwechsel vitaler Salmonella-Keime sind und deswegen für Selektivmedien genutzt werden, das Wachstum subletal geschädigter Keime hemmen (VAN SCHOTHORST und KAMPELMACHER, 1968; CLARK und ORDAL, 1969; CORRY et al., 1969; LICCIARDELLO et al., 1970; RAY et al., 1971a, b; RAY et al., 1972a; VAN SCHOTHORST und VAN LEUSDEN, 1972; TIWARI und MAXCY, 1972; JANSSEN und BUSTA, 1973; VAN SCHOTHORST und VAN LEUSDEN, 1975; VAN SCHOTHORST et al., 1977; HARTMAN, 1979;

ZIMMERMANN und WERNERY, 1979). Infolgedessen kann ein Produkt, welches eine derartige Keimflora beherbert, bei der Untersuchung eine dem tatsächlichen mikrobiologischen Status nicht entsprechende Sicherheit vortäuschen. Um dieses Risiko möglichst gering zu halten und eine Wiederbelebung (Resuscitation) subletal geschädigter Salmonellen zu erreichen, wird seit einigen Jahren die Einschaltung eines Voranreicherungsmediums bei der Untersuchung auf Salmonellen empfohlen, sofern eine solche Schädigung der Keime während des Herstellungsprozesses als gegeben angenommen werden kann. Für die Wiederbelebung subletal geschädigter Salmonellen in Trockenmilch soll - um einen osmotischen Schock zu vermeiden - zusätzlich zur Voranreicherung eine Rekonstitution von Vorteil sein (RAY et al., 1972b; VAN SCHOTHORST et al., 1979). Zu diesem Zweck wird vor der eigentlichen Wiederbelebungsphase das Probenmaterial mit einer geringeren Menge des Voranreicherungsmediums als im eigentlichen Resuscitationsabschnitt für ca. 30 min. bei Zimmertemperatur stehengelassen.

Herrscht weitgehend Einigkeit über den Nutzen einer Voranreicherung für den Nachweis subletal geschädigter Salmonellen, so bestehen allerdings z.T. erhebliche Unterschiede bezüglich der Art der eingesetzten Nährmedien (Tab. 11) bzw. über die Dauer (und z.T. auch Temperatur) der Wiederbelebungsphase (Tab. 12). Bei den Medien werden dabei insbesondere Vor- und Nachteile von Minimal- bzw. Maximalmedien diskutiert (MOSSEL und CORRY, 1977). Wenn sich auch die Fürsprecher der Maximalmedien weitgehend durchsetzen konnten - MOSSEL und CORRY (1977) halten z.B. die erfolgreiche Wiederbelebung mit Minimalmedien für die Ausnahme - so wird doch hin und wieder auch von positiven Erfahrungen mit Minimalmedien berichtet (nach WILSON und DAVIES (1976) war ein Glucose Mineralsalz Medium (M9) der Lactose Bouillon deutlich überlegen). Für die Voranreicherung von Salmonellen kommen von den Maximalmedien in erster Linie Lactose Bouillon, Tryptone Soya Broth, Nutrient Broth und gepuffertes Peptonwasser zur Anwendung (HURST, 1980). Lactose Bouillon ist in den USA gebräuchlicher, in Europa hingegen das gepufferte Peptonwasser (SIEMS, 1974). Bei der Auswahl

Tabelle 11: Bestandteile einiger Voranreicherungsmedien zum Salmonellennachweis *)

Medien		Inhaltsstoffe															
		Proteine				Kohlenhydrate/ Alkohole					Selektivstoffe, Farbstoffe Detergentien						
		Pepton	Fleisch	Hefe	Soyamehl	Dextrose	Lactose	Glycerin	Mannit	Dulcit	Brillant-grün	Galle	Desoxy-cholat	Citrat	Bromkre-solpurpur	Tween 80	Tergitol 7
Lactose Bouillon	(LB)	+	+				+										
Gepuff. Peptonwasser	(GPW)	+															
Tryptone Soya Broth	(TSB)	+			+	+											
Nutrient Broth	(NB)	+	+														
Gramnegative Broth	(GN)	+				+			+				+	+			
Tergitol 7 Broth	(T 7)	+		+			+										+
Eugon Broth	(Eu)	+				+											
Clausen Medium	(Cl)	+		+	+	+		+						+		+	
Purple broth base	**(PBB)**	+	+												+		
Dulcitol purple sugar broth	(DPSB)	+	+							+					+		
Mannitol purple sugar broth	(MPSB)	+	+						+						+		
Selenit Basis Medium	(SBM)	+					+										
EE Broth	(EEB)	+				+					+	+					

Anmerkung: *) Angaben über Mineralsalze bzw. Puffer in der Tabelle nicht enthalten

Tabelle 12: Voranreicherungsmedien für den Nachweis subletal geschädigter Salmonellen (unter Berücksichtigung von Inkubationszeit und -temperatur)

Medium	Inkubationszeit (h)	Inkubationstemperatur (°C)	untersuchtes Material	Autor(en)
Aqua dest.	24	30	Trockenhefe	BYRNE et al. (1955)
SPP[x)]	1-2	37	gefrorene Eiprodukte	MONTFORD u. THATCHER (1961)
LB[xx)]	5	37	Trockeneiklar	MONTFORD u. THATCHER (1961)
LB	24	35	Trockeneiklar	NORTH (1961)
MPSB[xx)]	18-24	?	Trockeneiklar	TAYLOR (1961)
DPSB[xx)] PBB[xx)]	24	37	Trockeneiklar	TAYLOR und SILLIKER (1961)
LB	24	35	Pastete; getrocknete Leb. mit	HALL et al. (1964)
LB	8	37	Eiprodukte	SILLIKER et al. (1964)
MB[x)]	18-24	37	Knochenmehl	GERICHTER und SECHTER (1966)
NB[xx)]	16-18	37	Fischmehl	VAN SCHOTHORST u. KAMPELMACHER (1968)
SBM[xx)]	4[a]	37	Eiklar; Fleischprodukte	ALFORD und KNIGHT (1969)
Aqua dest. + 0,002 % BG[x)]	24	35	Trockenmilch	POELMA et al. (1969)
TSB[xx)]	1-2	Zimm.' temper.	Trockenmaterial	MOSSEL und RATTO (1970)[b]
Wasser	2-3	25	gefriergetrocknete Magermilch	RAY et al. (1971b)
GPW[xx)]	18-24	37	Hackfleisch	EDEL u. KAMPELMACHER (1973)
GPW	18	37	Eipulver; Gefriervollei	PIETZSCH et al. (1975)
GPW	18	37	Milchpulver	VAN SCHOTHORST und VAN LEUSDEN (1975)
M9[x)]	3	37	Flüssigeiweiß	WILSON u. DAVIES (1976)
TSB + Gelatinase	24	35	Gelatine	PARK et al. (1977)
GPW	18	37	Kindertrockennahr.	MULINDWA und KÄFERSTEIN (1978)
GPW, TSB, M9	18	37	Hackfleisch	VAN SCHOTHORST et al. (1978)
GPW, TSB	6 + 15-18	22 37	Gefriergeflügel	SIEMS (1978)
Cl[xx)] Eu[xx)] GN[xx)] T7[xx)] LB, NB, EEB[xx)]	24	35	Lebens- und Futtermittel-Ingredienten	D'AOUST und MAISHMENT (1979)
GPW	18-24	37	sublet. geschäd. Bakteriensuspension	MULINDWA und PIETZSCH (1979)
CSPB[x)]	12	?	Tierkörpermehle	WERNERY und ZIMMERMANN (1981)

Erklärungen: SPP[x)] = Standard Phosphat Puffer
CSPB[x)] = Caso-Bouillon (Tryptone Soya Broth)
BG[x)] = Brillantgrün
M9[x)] = Glucose Mineralsalz Medium
MB[x)] = Mannitol Broth
xx) = siehe Tabelle 11
a = mit Schütteln
b = Enterobacteriaceae

des Voranreicherungsmediums sollte allerdings stets berücksichtigt werden, was für ein Probenmaterial untersucht wird. So konnte z.B. von mehreren Autoren bei Lactose Bouillon, Trypton Soya Broth und Nutrient Broth eine das Salmonellenwachstum negativ beeinflussende Wirkung des Kakaos beobachtet werden (GABIS und LANGLOIS, 1967; BUSTA und SPECK, 1968; PRICE und et al., 1972; ZAPATKA et al., 1977; PARK et al., 1979). Dieser bakterizide Effekt des Kakao konnte durch Zusatz von Casein zu Nutrient Broth bzw. durch Voranreicherung in Magermilch deutlich gemindert werden (ZAPATKA et al., 1977). In ähnlicher Weise konnten WILSON und DAVIES (1976) einen negativen Effekt der Kombination Lactose Bouillon / Magermilchpulver bzw. Knochenmehl auf die Resuscitation von hitzegeschädigten Salmonellen feststellen.

Der zweite Diskussionspunkt ist die Dauer der Resuscitationsphase. Wie aus Tabelle 12 ersichtlich, sind eine "kurze" (1 bis 6 h) und eine "lange" (18 bis 24 h) Voranreicherung üblich. Als Argumente für die kurze Inkubation werden angeführt, daß bei einer zu langen Voranreicherungsdauer sich eine gegen die gesuchten Keime richtende Wirkung entfalten könne, z.B. durch Säuerung des Milieus oder einfaches Überwuchern (VAN SCHOTHORST und VAN LEUSDEN, 1972) oder daß wenige, gering geschädigte Keime sich in der Zeit, in der die große Mehrheit noch resuscitiert wird, bereits vermehren und so ein falsches Bild geben (MOSSEL und CORRY, 1977). Für eine längere Wiederbelebungsphase spricht, daß stark geschädigte Keime sich in den kurzen Voranreicherungszeiten möglicherweise nicht erholen können. Zahlreiche der in Tabelle 12 aufgeführten Autoren konnten auch erst nach längerer, nicht aber bereits nach kurzer Resuscitation Salmonellen nachweisen (z.B. PIETZSCH et al., 1975; VAN SCHOTHORST und VAN LEUSDEN, 1975; MULINDWA und KÄFERSTEIN, 1978; D'AOUST und MAISHMENT, 1979; MULINDWA und PIETZSCH, 1979; WERNERY und ZIMMERMANN, 1981).

Abschließend sei noch darauf hingewiesen, daß eine gute Belüftung der Voranreicherung (z.B. durch Schütteln) einen so positiven Effekt auf

die Resuscitation der Salmonellen haben soll, daß Bebrütungszeiten von 18 bis 24 h hierdurch auf 6 bis 8 h verkürzt werden konnten (REUSSE, 1978).

2.5.2 Probenpläne

Die im Rahmen von Qualitätskontrollen und Einfuhrkontrollen (REUSSE und GEISTER, 1978) durchgeführte Untersuchung von Lebensmitteln auf die Anwesenheit von Salmonellen soll dem Verbraucher einen Schutz vor Gesundheitsschäden gewährleisten. Hundertprozentig könnte dieser Schutz jedoch nur sein, wenn eine Prüfung des gesamten Materials (Totalerhebung) erfolgen würde. Da dies aus ersichtlichen Gründen nicht möglich ist, versucht man, anhand von auf statistischen Modellen beruhenden Probenplänen durch gezielte Stichproben auf die wahrscheinliche Beschaffenheit der gesamten Charge zu schließen.

In der BRD war bereits 1956 in der Eiprodukte-VO ein derartiger Probenplan vorgesehen. Dieser Plan hatte - genau wie der in der Fassung von 1967 - jedoch den Nachteil, daß Chargenumfang und Stichprobenumfang miteinander verknüpft waren. Kleine Chargen boten daher, auch bei höher kontaminierten Gesamtheiten, ein geringeres Beanstandungsrisiko als große (WEISS et al., 1977). Die Neufassung der Eiprodukte-VO von 1975 brachte durch Erhöhung der Stichprobenzahl zwar Verbesserungen in dieser Beziehung, doch war damit auch eine beträchtliche Steigerung des Untersuchungsaufwandes verbunden. WEISS et al. (1977) leiteten aus dieser Situation zwei Forderungen an einen geeigneten Prüfplan ab: erstens muß der Stichprobenumfang von der Chargengröße unabhängig sein, und zweitens soll der Untersuchungsaufwand durch Einteilung der Lebensmittel in sogenannte Risikokategorien in vertretbaren Grenzen gehalten werden.

Prüfpläne, die neben anderen auch diese Bedingungen erfüllen, wurden in den USA ausgearbeitet. Durch zahlreiche Salmonellosen (z.B. die durch S.newbrunswick in Trockenmagermilch) bedingt, wurde 1966 ein umfangreiches Salmonella-Überwachungsprogramm initiiert und 1967 ein SALMONELLA-COMMITTEE bei der NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE / NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NAS/NRC) mit der Aufarbeitung des Salmonellenproblems beauftragt (OLSON, 1975).

Das Komitee veröffentlichte 1969 (Kurzfassung NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE / NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1970) die Ergebnisse seiner Arbeit und entwickelte Richtlinien u.a. auch für die Aufstellung von Prüfplänen, mit deren praktischer Umsetzung eine Gruppe unter Leitung von FOSTER beauftragt wurde. Deren Arbeitsergebnisse wurden 1971 als sogenannter FOSTER-Plan veröffentlicht (FOSTER, 1971). Der Plan basiert auf folgenden zwei grundsätzlichen Feststellungen:

1. Industriell hergestellte Lebensmittel differieren bezüglich des Risikos einer Kontamination mit Salmonellen.
2. Da es unmöglich ist, mit 100%iger Sicherheit die Anwesenheit von Salmonellen auszuschließen, muß ein Kompromiß mit einer etwas geringeren Sicherheit gefunden werden.

Als Ergebnis dieser Überlegungen wurden drei Produktcharakteristika festgesetzt, die die Wahrscheinlichkeit einer Kontamination mit Salmonellen wesentlich beeinflussen und daher als Risikofaktoren bezeichnet werden:

A) Das Erzeugnis bzw. einer oder mehrere seiner Bestandteile sind erfahrungsgemäß eine wesentliche potentielle Quelle für Salmonellen.

B) Der Be- und Verarbeitungsprozeß beinhaltet keinen die Salmonellen abtötenden Arbeitsvorgang (z.B. Erhitzung, Säuerung).

C) Eine Vermehrung vorhandener Salmonellen ist bei unsachgemäßer Behandlung des Produktes während der Distribution oder beim Verbraucher möglich. Dadurch können wenige, ursprünglich in der Regel kein Risiko darstellende Salmonellen sich vermehren und eine Erkrankung hervorrufen.

In Abhängigkeit von dem Vorliegen dieser Risikofaktoren ergeben sich für die Lebensmittel verschiedene Risikokategorien (Tabelle 13).

Tabelle 13: Risikokategorien für Lebensmittel entsprechend dem FOSTER-Plan

Lebensmittel für	Risikofaktoren: Erzeugnis bzw. Bestandteile (häuf. Kontamin.)	Be-/Verarbeitungsprozeß	unsachgemäße Behandl.	Risikokategorie
Kinder, Kranke, Senioren	+	+/-	+/-	I
sonstige Konsumenten	+	+	+	II
	+	+	-	III
	+	-	+	
	-	+	+	
	+	-	-	IV
	-	+	-	
	-	-	+	
	-	-	-	V

\+ vorhanden - nicht vorhanden

Bei der Risikokategorie I wird außerdem noch die Empfindlichkeit der Konsumenten berücksichtigt. Diese Kategorie beinhaltet nicht sterile Erzeugnisse (z.B. Trockenmilchprodukte), die für Kinder, Kranke und Senioren bestimmt sind, also für eine gegenüber den sonstigen Konsumenten besonders exponierte Verbrauchergruppe. Unter Berücksichtigung dieser verschiedenen Risikokategorien sind unterschiedliche Probenpläne aufgestellt worden, in denen die Anzahl der zufallsmäßig aus einer Charge zu ziehenden und Salmonella-negativen Proben (à 25g) festgelegt ist, die mit 95%iger Sicherheit den Rückschluß für die gesamte Charge erlaubt, daß eine Kontamination mit mehr als einer Salmonelle bezogen auf eine definierte Produktmenge nicht vorliegt (Tabelle 14).

Tabelle 14: Annahmeplan bei Untersuchung von Einzelproben (nach FOSTER)

Risiko-kategorie	Anzahl der Proben (25 g)		≤1 Keim pro
	getestet	positiv	
I	60	0	500 g *
II	30	0	250 g *
III-V	15	0	125 g *

*p ≤5 %

Die gleiche Sicherheit von 95%, nicht mehr als 1 Salmonelle in der jeweiligen Produktmenge zu haben, ist auch dann noch gewahrt, wenn sich bei der Untersuchung der in Tabelle 14 vorgeschriebenen Probenzahlen nur eine als Salmonellen-haltig erweist und bei der zusätzlichen Untersuchung einer festgelegten Anzahl weiterer Proben kein positives Ergebnis mehr auftritt. Die Gesamtzahl der unter solchen Verhältnissen zu prüfenden Stichproben findet sich in Tabelle 15.

Tabelle 15: Annahmeplan bei Untersuchung von Einzelproben (nach FOSTER)

Risiko-kategorie	Anzahl der Proben (25 g)		≤1 Keim pro
	getestet	positiv	
I	95	1	500 g*
II	48	1	250 g*
III - V	24	1	125 g*

*p ≤5 %

Dieses Vorgehen ist aber nach OLSON (1975) vom gesetzgeberischen Standpunkt (hier FOOD AND DRUG ADMINISTRATION) nicht akzeptabel. Einige wesentliche Aspekte des sogenannten FOSTER-Planes sollen noch kurz angerissen werden:

1. Es ist vorher festzulegen, was unter Charge genau zu verstehen ist (LEUSSINK, 1975). INGRAM et al. (1974) definieren z.B. die Charge (lot) als die Menge eines Lebensmittels, die unter einheitlichen Bedingungen produziert und behandelt wurde, in der Praxis also ein Lebensmittel, das in einem begrenzten Zeitabschnitt hergestellt wurde. Nur über eine derartig erfaßte Produktmenge kann mittels Stichprobe eine Aussage gemacht werden.

2. Der FOSTER-Plan geht von einer homogenen Verteilung der Salmonellen im Material aus. Dies scheint jedoch nicht unbedingt der Fall zu sein (REUSSE et al., 1976) und entzieht damit dem Plan seine korrekte wahrscheinlichkeitstheoretische Basis (REUSSE und GEISTER, 1978) bzw. birgt die Gefahr der Unterschätzung der Belastung mit Salmonellen in sich.

3. Der Probenplan wurde nicht entwickelt, andere in der Routineuntersuchung angewandte Überwachungsmethoden zu ersetzen, sondern soll eine endgültige Antwort auf die Frage geben, ob die betreffende Charge zurückgewiesen bzw. angenommen wird (FOSTER, 1971). Deshalb schlagen INGRAM et al. (1974) auch für die Routineuntersuchung andere Zweiklassen-Systeme, je nach Risiko, vor und behalten die hohen Anforderungen des FOSTER-Planes besonderen Fällen vor.

2.5.3 Rationalisierung des direkten Nachweises von Salmonellen durch Untersuchung von Sammelproben

Werden Untersuchungen nach dem FOSTER-Plan durchgeführt, so sind sie - insbesondere, wenn es sich um Produkte der Risikokategorie I handelt - für das betreffende Labor mit einem sehr hohen Arbeits- und Materialaufwand verbunden. Eine sich anbietende Rationalisierungsmöglichkeit ist die Prüfung der je nach Risikokategorie geforderten Anzahl von Einzelproben als eine oder mehrere Sammelprobe(n).

Derartige Untersuchungen bei getrockneten Lebens- und Futtermitteln lassen sich in zwei Techniken unterteilen. Ein System besteht darin, bereits die Einzelproben zu "poolen" und in einer entsprechenden Menge

Voranreicherungsmedium zu bebrüten, das andere darin, die Einzelproben getrennt voranzureichern und dann in einer einzigen Selektivanreicherung zu poolen ("wet compositing").

Erste Versuche zur Effizienz von Sammelproben zum Nachweis von Salmonellen führte SILLIKER bereits im Rahmen der Erhebungen des NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE/NATIONAL RESEARCH COUNCIL (1969) durch. Die bei der Untersuchung von 389 Chargen von Trockeneiprodukten sowohl über Sammelproben zu 400 g als auch über 16 je 25 g umfassende Einzelproben erzielten Resultate lassen einen leichten Empfindlichkeitsverlust bei den Sammelproben vermuten. Eine bessere Übereinstimmung zwischen Einzel- und Sammelproben registrierten HUHTANEN et al. (1972), die vergleichend jeweils eine 300 g umfassende Sammelprobe und 10 aus 30 g bestehende Einzelproben (Fleisch- und Knochenmehl) prüften. Bei 25 solcher Tests erzielten sie 17 mal positive Ergebnisse mit den Sammelproben und 18 mal mit den Einzelproben. Diese Ergebnisse kamen dadurch zustande, daß Salmonellen einmal nur über die Sammelprobe, zweimal nur über die Einzelproben nachgewiesen werden konnten. SILLIKER und GABIS (1973) verglichen dann die Nachweissicherheit von Salmonellen in natürlich kontaminierten Trockenmaterialien über 60 Einzelproben à 25 g, 15 Sammelproben à 100 g und 3 Sammelproben à 500 g. Alle Methoden waren etwa gleichwertig. Unterschiede traten allgemein nur in Verbindung mit einem geringen Kontaminationsgrad auf. In einem Fall konnten z.B. allein über die drei 500 g-Sammelproben Salmonellen isoliert werden. In ergänzenden Experimenten konnte auch die Brauchbarkeit von 1500 g umfassenden Sammelproben registriert werden. Das gleiche Autorenteam (GABIS und SILLIKER, 1974) bestätigte diese Angaben für Lebensmittel mit hohem Feuchtigkeitsgehalt.

SILLIKER (1969) war auch der erste Autor, der über den Effekt der "wet compositing"-Technik berichtete: Aus 1060 Proben wurden 106 Sammelproben durch Poolen von je 10 Einzelvoranreicherungen hergestellt. In sieben Fällen erbrachten die Sammelproben trotz positiver Ergebnisse

bei einer oder mehreren der 10 Einzelproben negative Resultate. PRICE et al. (1972) konnten demgegenüber keinen nachteiligen Effekt bei dieser Technik des Poolens feststellen. Verschiedene Trockennahrungsmittel, darunter auch Trockenmagermilch, wurden mit 0,06 bis 3000 Salmonellen/g künstlich kontaminiert, bevor eine kontaminierte mit bis zu 24 nicht kontaminierten Proben in der Selektivanreicherung gepoolt wurden. Die positiven Proben konnten in dem gepoolten Material genauso sicher wie in den Einzelvoranreicherungen gefunden werden. Es fällt allerdings auf, daß weder aus der Einzel- noch aus der Sammelprobe 0,06 Salmonellen/g nachgewiesen werden konnten. Die Autoren verglichen auch die Effektivität von Sammelproben gegenüber gepoolten Voranreicherungen und befanden die letztere Methode als besser geeignet, wobei neben der besseren Nachweisempfindlichkeit noch als Vorteil angeführt wird, daß eine Portion jeder Einzelvoranreicherung in ein Röhrchen überführt und für eine Nachuntersuchung aufbewahrt werden kann (eine neuere Untersuchung von D'AOUST et al. (1980b) zeigt, daß eine Lagerung bei niedrigen Temperaturen den Nachweis nicht wesentlich mindert).

Zusammenfassend läßt sich zu den angeführten Untersuchungen sagen, daß ihre Ergebnisse keinen Verlust der Nachweissicherheit bei Sammelproben gegenüber Einzelproben vermuten lassen. Deshalb wird auch in verschiedenen Methodenempfehlungen auf diese Rationalisierungsmöglichkeit hingewiesen (z.B. POELMA und SILLIKER, 1976; IDF E-Doc 105, Sept. 1979; DIN 10 181, Entw. vom Febr. 1980).

2.5.4 Enterobacteriaceae als Index-Mikroorganismen für die Anwesenheit von Salmonellen

Die Untersuchung von Lebensmitteln auf die Anwesenheit von Salmonellen kann bei Anwendung von Probenplänen mit dem Nachteil behaftet sein, daß es zu falsch-negativen Ergebnissen kommt, da diese Keime im Material häufig heterogen verteilt sind (VAN SCHOTHORST et al., 1966; RAY et al., 1971c). Infolgedessen können auch negative Untersuchungsergebnisse bei Stichproben mehrerer Produktionschargen nur Aussagekraft für die jeweils geprüften Stichproben und mit Einschränkung für die jeweils zugrundeliegenden Chargen haben (DRION und MOSSEL, 1972), nicht aber für die gesamte Produktion. Auch bei einer geringfügigen Kontamination mit dem pathogenen Keim und einer starken Begleitflora kann dessen direkter Nachweis versagen (THATCHER und CLARK, 1968). Die Überlegung, die Lebensmittel statt auf Salmonellen auf andere Mikroorganismen zu untersuchen, die in ihrer Resistenz gegen äußere Einflüsse ein ähnliches Verhalten zeigen wie Salmonellen, aber leichter nachweisbar sind, und aus deren An- bzw. Abwesenheit auch auf die der letzteren zu schließen, bietet sich als möglicher Ausweg aus dieser Situation an (BUTTIAUX und MOSSEL, 1961). Mikroorganismen, aus deren Anwesenheit auf das mögliche Vorkommen pathogener Keime bzw. unzureichende Gewinnung, Be- und Verarbeitung von Lebensmitteln geschlossen wurde, bezeichnete man im übrigen früher allgemein als Indikator-Mikroorganismen. Seit einigen Jahren soll, einer Anregung von INGRAM (1977) folgend, zwischen Indikator- und Index-Mikroorganismen unterschieden werden, um ökologische Mißverständnisse hinsichtlich der Interpretation des Nachweises dieser Keime in Lebensmitteln und Wasser zu vermeiden. Entsprechend der Definition von INGRAM weist die Anwesenheit von Indikator-Mikroorganismen in Lebensmitteln, die im Hinblick auf Haltbarkeit oder Sicherheit erhitzt oder sonstwie dekontaminiert worden sind, in Mengen, die vorgeschriebene Grenzen an koloniebildenden Einheiten pro Gramm überschreiten, nur auf eine unzureichende Behandlung (zu niedrige Letalität bzw. nachträgliche Rekon-

taminierung) hin. Die Anwesenheit oder Abwesenheit von pathogenen Keimen ist in diesem Zusammenhang vollkommen irrelevant. Im Gegensatz dazu verfolgt die Prüfung von Lebensmitteln oder Wasser auf das Vorhandensein von Index-Mikroorganismen die Feststellung der Möglichkeit, daß diese Materialien mit pathogenen Mikroorganismen kontaminiert sein können. Daher sollte die Anwesenheit von gewissen pathogenen Keimen immer zu einem positiven Befund für Index-Mikroorganismen führen (MOSSEL et al., 1978).

Versuche, geeignete Keime als Index-Mikroorganismen für Salmonellen zu finden, sind schon seit vielen Jahren durchgeführt worden. Seit gegen Ende des 19. Jahrhunderts bekannt wurde, daß E. coli im allgemeinen ein natürlicher Darmbewohner des Menschen ist, versuchte man z.B., die Verunreinigung von Trinkwasser durch Fäzes und damit das Risiko einer Kontamination mit S. typhi, für die damals kaum Nachweismöglichkeiten bestanden, über den Nachweis von E. coli abzuschätzen. Schon wenig später dehnte man die Untersuchung auf die Gruppe der sogenannten Coliformen aus. Damit kam allerdings ein Element der Unsicherheit in das ursprüngliche Konzept, da einige Coliforme auch außerhalb des Verdauungstraktes auftreten können (MOSSEL, 1967). Das Problem versuchte man durch die Einführung der Untersuchung auf "Coliforme fäkalen Ursprungs" zu umgehen. Durch erhöhte Bebrütungstemperatur sollte eine Wachstumshemmung der nicht an den Darm adaptierten Vertreter der Coliformen erreicht werden; dies gelingt aber nicht immer (FISHBEIN et al., 1976). Nach THATCHER und CLARK (1968) ist die Anwesenheit von E. coli ebenso wie von fäkalen Coliformen bei den meisten Lebensmitteln im allgemeinen ein recht guter Hinweis auf fäkale Verunreinigungen, während die Anwesenheit von Coliformen (außer E. coli) und fäkalen Coliformen auf eine ungenügende Behandlung des Lebensmittels bzw. mangelnde Hygiene bei seiner Herstellung schließen läßt. Ein wesentlicher Nachteil des Nachweises der nur lactosespaltenden Vertreter der Enterobacteriaceae liegt darin, daß Lactose-negative Enterobacteriaceae nicht erfaßt werden, obwohl ihre fäkale Herkunft in vielen Fäl-

len als gegeben anzunehmen ist (SEELIGER, 1952). Dieser Hinweis wurde schon bald aufgegriffen und insofern berücksichtigt, als die Lactose in den festen Nährböden durch andere Substrate, insbesondere Glucose, ersetzt wurde (HENRIKSEN, 1955; MOSSEL, 1957, 1958; MOSSEL et al., 1962). Vorzüge des Nachweises der Glucose-spaltenden Enterobacteriaceae ergeben sich auch daraus, daß Coliforme weniger resistent sind als einige Salmonellen (THATCHER und CLARK, 1968) und daher durch ihre Abwesenheit eine falsche Sicherheit des Produktes vortäuschen (MOSSEL, 1964; SOLBERG et al., 1976). Dies soll allerdings nicht für unbearbeitete, in rohem Zustand belassene Lebensmittel zutreffen, bei denen die Prüfung auf E. coli die Methode der Wahl sein soll (MOSSEL, 1975b).

Zwar wird in einigen Ländern eine parallele Untersuchung auf Enterobacteriaceae und pathogene Darmbakterien durchgeführt (MOSSEL, 1977), doch gibt es gewichtige Argumente, die, aufbauend auf heute zur Verfügung stehende empfindliche Nachweisverfahren (MOSSEL und RATTO, 1970; MOSSEL et al., 1962; MOSSEL et al., 1963; MOSSEL et al., 1979) für eine alleinige Untersuchung auf Enterobacteriaceae als Index-Mikroorganismen sprechen:

- die wiederholt durch laufende Überprüfung bestätigte Abwesenheit von Enterobacteriaceae macht es sehr unwahrscheinlich, daß in derselben Produktionslinie hergestellte Nahrungsmittel gefährliche Kontaminanten enthalten (DRION und MOSSEL, 1972);
- die aufwendige Untersuchung auf Salmonellen kann beträchtlich rationalisiert werden (MOSSEL, 1977);
- in Entwicklungsländern ist diese Form der laufenden Kontrolle oft die einzig mögliche (MOSSEL, 1977);
- auch wenn unterschiedliche Auffassungen zu diesem Problem geäußert werden (BUSSE, 1980), wird doch allgemein in der BRD davon ausgegangen, daß die betriebseigenen Labors der Nahrungsmittelhersteller nur unter bestimmten Auflagen auf Salmonellen untersuchen dürfen, während sich einer Prüfung auf Enterobacteriaceae rechtlich gesehen keine Hindernisse in den Weg stellen.

Voraussetzung für die Brauchbarkeit derartiger Untersuchungsmethodiken ist es, daß eine enge Beziehung zwischen den Ergebnissen der herkömmlichen Untersuchungen auf Salmonellen und denen auf Index-Mikroorganismen besteht. Es ergibt sich z.B. die Frage: Wie viele Proben von welchem Umfang müssen auf Enterobacteriaceae geprüft werden, um eine gleiche Sicherheit zu gewährleisten (DRION und Mossel, 1972) wie bei dem FOSTER-Plan (FOSTER, 1971), demzufolge z.B. eine negativ ausfallende Untersuchung bei 60 Proben à 25g eine 95%ige Sicherheit beinhaltet, daß nicht mehr als 1 Salmonelle in 500g enthalten ist. Um einen entsprechenden Probenplan entwerfen zu können, ist die Kenntnis über das Verhältnis von Gesamt-Enterobacteriaceae und Salmonellen in einem bestimmten Lebensmittel notwendig, das von MOSSEL (1977) auch als Epsilon (ε)-Faktor bezeichnet wurde.

$$\varepsilon = \frac{\text{KbE/g der Enterobacteriaceae}}{\text{MPN/g der Salmonellen}}$$

Untersuchungen von DRION und MOSSEL (1972, 1977) ergaben, daß der ε-Faktor in verschiedenen Trockenprodukten weiten Schwankungsbereichen unterliegt, sich aber ein Mittelwert in der Größenordnung von ca. 10^3 ergibt. Auf diesen Grundlagen aufbauend entwickelten die beiden Autoren einen Probenplan, der die Untersuchung von 1 - 2 g Material auf Enterobacteriaceae vorsieht und der, da im Falle eines positiven Ergebnisses die Ware zurückgewiesen wird, dem Verbraucher einen genauso hohen Schutz wie bei der direkten Untersuchung auf Salmonellen gewährleisten soll. Obwohl einige Autoren die Brauchbarkeit der Enterobacteriaceae als Index-Mikroorganismen bestätigen (z.B VAN SCHOTHORST et al., 1966; DRION und MOSSEL, 1977), wird dies von anderer Seite angezweifelt (REUSSE et al., 1976; SILLIKER und GABIS, 1976; MERCURI et al., 1978), wobei als Hauptargument die Schwierigkeit genannt wird, eine Relation zwischen dem Auftreten der beiden Keimgruppen herzustellen.

3. Eigene Untersuchungen

Die eigenen Untersuchungen gliedern sich in zwei Hauptabschnitte. Im ersten Teil wurden vergleichende Untersuchungen zum Vorkommen von Enterobacteriaceae und Salmonellen in Milchprodukten durchgeführt, um Hinweise darauf zu erhalten, ob und inwieweit der Nachweis von Enterobacteriaceae einen Rückschluß auf die eventuelle Anwesenheit von Salmonellen erlaubt. Im zweiten Teil wurden Experimente zur Frage vorgenommen, ob anstelle von mehreren Einzelproben (wie es entsprechend dem FOSTER-Plan vorgesehen ist) auch Sammelproben auf die Anwesenheit von Salmonellen geprüft werden können, ohne daß dadurch die Sicherheit der Untersuchungsergebnisse beeinträchtigt wird.

3.1 Vergleich der Enterobacteriaceae Most Probable Number mit dem Nachweis von Salmonellen in Milchprodukten

3.1.1 Material

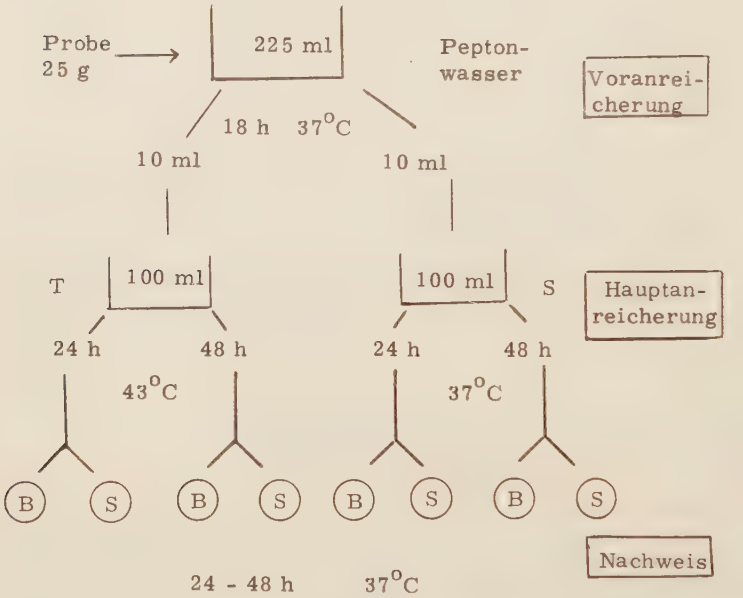
Das zur Untersuchung verwendete Probenmaterial stammte aus verschiedenen Trockenmilchprodukte herstellenden Betrieben. Im einzelnen handelte es sich um: zuckerhaltiges Milchmixgetränk (Trockenmaterial), Trockenkaseinat, Molkenpulver, Magermilchpulver, Vollmilchpulver, Molke (flüssig), Fettkonzentratpulver (50 % Fett und 50 % Magermilchpulver), Trockenkasein, Käsepulver, kakaohaltige Trockenmilchprodukte. Daneben wurden Stufenkontrollen im laufenden Produktionsprozeß vorgenommen und Umgebungsproben aus den Herstellungsräumen entweder als Trockenmaterial genommen oder als Tupferprobe.

3.1.2 Methodik

3.1.2.1 Nachweis von Salmonellen

Der Nachweis von Salmonellen wurde in Anlehnung an die Vorschriften der Anlage 2 zur Eiprodukte-VO und dem Entwurf der DIN-Norm 10 181 (Nachweis von Salmonellen in Milch, Milchprodukten und Speiseeis) durchgeführt (Abbildung 1).

Abbildung 1: Nachweis von Salmonellen in Milchprodukten



T = Tetrathionat-Nährmedium

S = Selenit-Nährmedium

B = Brillantgrün-Phenolrot-Agar

S = Salmonella-Shigella-Agar

Nach Voranreicherung einer Probenmenge von 25 g in 225 ml gepuffertem Peptonwasser (VAN SCHOTHORST und VAN LEUSDEN, 1972), die zur Erreichung einer flachen Schicht (REUSSE, 1978) in 1000 ml fassenden Erlenmeyerkolben bei 37°C für etwa 18 Std. durchgeführt wurde, erfolgte die Übertragung von 10 ml in 100 ml der von EDEL (1974) beschriebenen Tetrathionat-Brillantgrün-Galle-Bouillon nach Muller/

Kauffmann (MK) und zusätzlich in gleichen Verhältnismengen in die nach LEIFSON (1936) modifizierte Selenit-Bouillon (SEL).

Schlecht lösliche Materialien, z.B. Caseinat, wurden zunächst im Schüttelbrutschrank 4 Std. bei 37°C mit einer Schüttelfrequenz von 150-200/min gelöst und vorbebrütet. Die Bebrütungsdauer der Voranreicherung wurde dann um 2 - 4 Std. verkürzt. Bei der Untersuchung stark fetthaltiger Proben wurde der Voranreicherung in einigen orientierenden Untersuchungen Tergitol Nr. 7 R (Endkonzentration: 0,5 %) - in Anlehnung an einen Normentwurf des Internationalen Milchwirtschaftsverbandes - zugesetzt. Kakaohaltige Proben wurden in steriler Magermilch mit 0,002 % Brillantgrün als Voranreicherungsmedium untersucht. Auf eine Bebrütung im Schüttelbrutschrank wurde bei derartigen Proben grundsätzlich verzichtet, da durch Bewegung anscheinend im Kakao enthaltene antimikrobiell wirksame Substanzen vermehrt freigesetzt werden (BUSTA und SPECK, 1968).

Nach 24 bzw. 48 Std. Inkubation des MK-Mediums bei 43°C (die Bebrütung von MK bei erhöhter Temperatur wird von EDEL und KAMPELMACHER (1969) empfohlen) und des SEL-Mediums bei 37°C erfolgte die Subkultivierung dieser Hauptanreicherung mittels Verdünnungsausstrich auf den von EDEL (1974) publizierten modifizierten Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose-Agar (BGA) und auf den von DIFCO (1953) entwickelten Salmonella-Shigella-Agar (SSA) sowie stichprobenmäßig auf Wismut-Sulfit-Agar nach Wilson/Blair (um eventuell vorhandene lactose-positive Salmonellastämme zu erfassen). Einer Empfehlung von LITCHFIELD (1973) folgend wurden die BGA-Platten 24 h vor Gebrauch hergestellt und getrocknet; durch die Trocknung soll das Schwärmen von Proteus besser unterdrückt werden. Nach 24 - 48 Std. Inkubation bei 37°C wurden verdächtige Kolonien auf Drei-Zucker-Eisen-Agar (HAJNA, 1945) übertragen und anschließend, wenn dieser eine für Salmonellen typische Reaktion zeigte, serologisch mittels amtlich zugelassener polyvalenter Salmonella-Antiseren geprüft. Als letzter Schritt schloß sich die in der Eiprodukte-VO vorgesehene Prüfung des Verhaltens in den biochemischen Reaktionen Lactose, Harnstoff, Indol, Lysindecarboxy-

lase und Voges-Proskauer-Test an. Die biochemischen Tests wurden z.T. auch mit Enterotube^{R} durchgeführt.

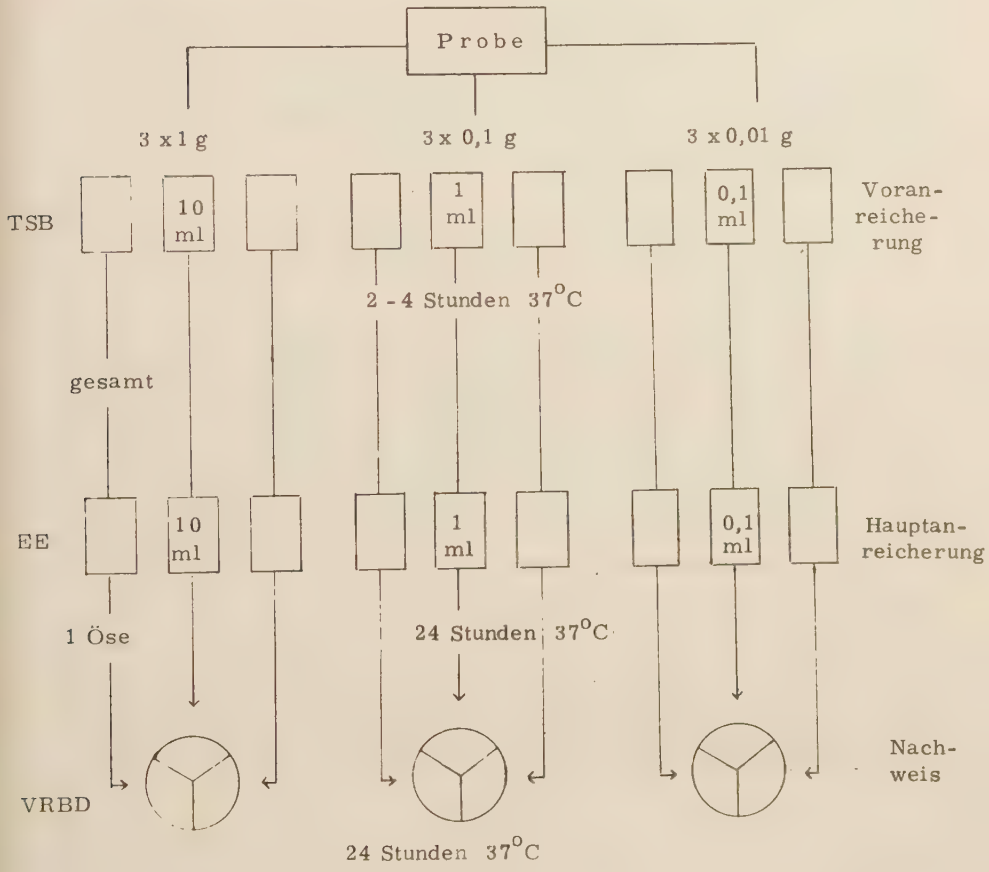
3.1.2.2 Nachweis von Enterobacteriaceae

Da bei den zu prüfenden Produkten ähnlich wie im Fall der Salmonellen auch bei den Enterobacteriaceae eine subletale Schädigung zu erwarten war, wurde bei ihrem Nachweis, abweichend von der Eiprodukte-VO, ebenfalls eine Wiederbelebung durchgeführt (Abbildung 2). Das Untersuchungsmaterial wurde entsprechend der Empfehlung von MOSSEL und RATTO (1970) im Verhältnis 1 : 10 in Tryptone-Soya-Broth (TSB) gelöst und bei 37^{o}C mit einer Schüttelfrequenz von 150-200/min 2-4 Std. im Schüttelbrutschrank inkubiert. Wie beim Salmonellennachweis wurde auf das Schütteln verzichtet, wenn kakaohaltige Proben vorlagen und stattdessen die Bebrütungsdauer für die Voranreicherung um 1 bis 2 Std. verlängert. Anschließend erfolgte die Übertragung der gesamten Voranreicherung in gleiche Mengen doppelt konzentrierter Enterobacteriaceae-Enrichment-Broth (EE), die von MOSSEL et al. (1963) entwickelt wurde. Diese Selektivanreicherung wurde 24 Std. bei 37^{o}C bebrütet und anschließend auf dem von MOSSEL et al. (1962) beschriebenen Violet-Red-Bile-Dextrose-Agar (VRBD) abgeimpft. Nach 24 Std. Bebrütung bei 37^{o}C wurden typische Kolonien dem Cytochromoxydase-Test unterzogen, um Cytochromoxydase-positive Keime, die eine ähnliche Reaktion auf dem verwendeten Agar zeigen wie Enterobacteriaceae, auszuschließen.

In einem einleitenden Versuchsabschnitt wurden die Enterobacteriaceae-Nachweise auf Probenmengen von nur 1 oder 2 g (einfacher Ansatz) beschränkt, da nach Angaben von DRION und MOSSEL (1972; 1977) die Untersuchung von 1 oder 2 x 1 g den gleichen Verbraucherschutz gewährleisten soll wie die Untersuchung von 60 Proben à 25 g auf Salmonellen.

Während bei den MPN-Bestimmungen zunächst von Probenmengen von 10 g - 1 g - 0,1 g ausgegangen wurde, wurden später nur Probenmengen von 1 g - 0,1 g - 0,01 g berücksichtigt. Dabei wurde im Hinblick auf die

Abbildung 2: Nachweis von Enterobacteriaceae in Milchprodukten



TSB = Tryptone-Soya-Broth

EE = Enterobacteriaceae-Enrichment-Broth

VRBD = Violet-Red-Bile-Dextrose-Agar

gestellte Aufgabe (Beziehung zwischen MPN-Keimzahl an Enterobacteriaceae und evtl. nachzuweisenden Salmonellen) jeweils ein dreifacher Ansatz vorgenommen. Aus der Anzahl der auf VRBD positiven Ausstriche pro Ansatz wurde in Anlehnung an KLEEBERGER (1978) eine sogenannte Stichzahl gebildet und danach aus einer McCrady-Tabelle die wahrscheinlichste Keimzahl (MPN) ermittelt.

3.1.2.3 Herkunft der für den Nachweis von Salmonellen und Enterobacteriaceae verwendeten Nährböden und Reagenzien

Die Nährböden, deren Zusammensetzung in den Tabellen 16 und 17 aufgeführt ist, wurden von der Fa. Oxoid als Trockennährböden bezogen - mit Ausnahme des Voranreicherungsmediums für kakaohaltige Produkte, das aus den einzelnen Bestandteilen (Brillantgrün, Fa. Chroma) hergestellt wurde. Die polyvalenten Salmonella-Antiseren I und II stammten von den Behring-Werken. Die für die biochemische Prüfung Salmonella-verdächtiger Kolonien (Lactose, Harnstoff, Indol, Lysindecarboxylase, Voges-Proskauer-Test) erforderlichen Medien wurden nach Vorschrift der Eiprodukte-VO selbst hergestellt bzw. im Falle des Lysindecarboxylasetests von der Fa. Oxoid bezogen. Bei der Prüfung einiger Stämme wurde auch Enterotube^{R} von der Fa. La Roche miteinbezogen. Die Reagenzien für den Cytochromoxidase-Test stammten von der Fa. Merck.

Tabelle 16: Zusammensetzung der für den Salmonellennachweis verwendeten Medien

Gepuffertes Peptonwasser

Fleischpepton	10 g
NaCl	5 g
$Na_2HPO_4 \cdot 12\ H_2O$	3,5 g
KH_2PO_4	1,5 g
Aqua dest.	1000 ml
pH	7,2 ± 0,1

Tetrathionat-Brillantgrün-Galle-Bouillon nach Muller/Kauffmann (modifiziert)

Caseinpepton	7 g
Soyamehlpepton	2,3 g
NaCl	2,3 g
$CaCO_3$	25 g
$Na_2S_2O_3$	40,7 g
Rindergalle	4,75 g
Aqua dest.	1000 ml
Jod-Kaliumjodidlösung (20 g Jod, 25 g KJ in 100 ml Aqua dest.)	19 ml
0,1%ige Brillantgrünlös.	9,5 ml

Selenit-Bouillon

Fleischpepton	5 g
Lactose	4 g
Natriumphosphat	10 g
Natriumbiselenit	4 g
Aqua dest.	1000 ml

Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose-Agar (modifiziert)

Lab-Lemco-Pulver	5 g
Fleischpepton	10 g
Hefeextract	3 g
Na_2HPO_4	1 g
NaH_2PO_4	0,6 g
Lactose	10 g
Saccharose	10 g
Phenolrot	0,09 g
Brillantgrün	0,0047 g
Agar	12 g
Aqua dest.	1000 ml
pH	6,9

Fortsetzung Tabelle 16:

Salmonella-Shigella-Agar	
Lab-Lemco-Pulver	5 g
Pepton	5 g
Lactose	10 g
Gallensalze	8,5 g
Natriumcitrat	10 g
Natriumthiosulfat	8,5 g
Eisen (III)-citrat	1 g
Brillantgrün	0,00033g
Neutralrot	0,025 g
Agar	15 g
Aqua dest.	1000 ml
pH	7,0

Wismutsulfit-Agar (modifiziert)	
Lab-Lemco-Pulver	5 g
Pepton	5 g
Dextrose	5 g
Dinatriumphosphat	4 g

(Fortsetzung Wismutsulfit-Agar (modifziert)	
Eisen (II)-Sulfat	0,3 g
Wismutsulfit-Indikator	8 g
Brillantgrün	0,016 g
Agar	12,7 g
Aqua dest.	1000 ml
pH	7,7

Dreizucker-Eisen-Agar	
Lab-Lemco-Pulver	3 g
Hefeextrakt	3 g
Pepton	20 g
NaCl	5 g
Lactose	10 g
Saccharose	10 g
Dextrose	1 g
Eisen (III)-citrat	0,3 g
Natriumthiosulfat	0,3 g
Phenolrot	q.s.
Agar	12 g
Aqua dest.	1000 ml
pH	7,4

Tabelle 17: Zusammensetzung der für den Enterobacteriaceaenachweis verwendeten Nährböden

Tryptone-Soya-Broth	
Caseinpepton	17 g
Sojamehlpepton	3 g
Dextrose	2,5 g
NaCl	5 g
K_2HPO_4	2,5 g
Aqua dest.	1000 ml
pH	7,3
Enterobacteriaceae-Enrichment-Broth	
Pepton	10 g
Dextrose	5 g
Na_2HPO_4	6,45 g
KH_2PO_4	2 g
Rindergalle, gereinigt	20 g
Brillantgrün	0,0135 g
Aqua dest.	1000 ml
pH	7,2
Violet-Red-Bile-Dextrose-Agar x)	
Hefeextrakt	3 g
Pepton	7 g
NaCl	5 g
Gallensalze	1,5 g
Lactose	10 g
Dextrose	10 g
Neutralrot	0,03 g
Kristallviolett	0,002 g
Agar	12 g
Aqua dest.	1000 ml
pH	7,4

Anmerkung: x) wird inzwischen von OXOID in anderer Zusammensetzung angeboten

3.1.3 Ergebnisse

Von den 52 mittels MPN-Technik untersuchten Produktproben enthielten - wie aus den Tabellen 18 - 21 hervorgeht - 28 Enterobacteriaceae, von den 14 in gleicher Weise getesteten Umgebungsproben waren 13 positiv (Tabelle 22). Der Gehalt an Enterobacteriaceae belief sich bei diesen Proben auf 0,4 / g bis >140/g bzw. ml (Produkte) bzw. 1,5 bis >140/g (Umgebungsproben). Salmonellen wurden nur in Proben (untersuchte Menge jeweils 25 g) nachgewiesen, in denen auch Enterobacteriaceae gefunden worden waren (Tabellen 18 - 22), und zwar in 9 (Produkte) bzw. 4 Proben (Umgebungsuntersuchungen).

Tabelle 18: Vorkommen von Enterobacteriaceae und Salmonellen in verschiedenen Milchprodukten

Material (Anzahl der untersuchten Proben)	Proben-nummer	Enterobacteriaceae MPN (pro g)	Salmonellen (pro 25 g)
Vollmilchpulver (5)	1 + 2	0	neg
	3 - 5	0,4	neg
Magermilchpulver (5)	1 - 5	0	neg
Trockenkaseinat (7)	1	1,5	neg
	2	0	neg
	3	0,9	pos
	4	0,9	neg
	5 + 6	0,4	pos
	7	2,0	pos
Molkenpulver (12)	1 - 9	0	neg
	10 - 12	0,4	neg
Molke (1)	1	>140	pos
Milchmixgetränke-Pulver (4)	1	0,9	neg
	2	0,4	pos
	3	0	neg
	4	2,5	neg

Tabelle 19: Vorkommen von Enterobacteriaceae und Salmonellen in Proben, die im Rahmen von zwei Stufenkontrollen bei der Herstellung von Trockenkasein entnommen wurden

Untersuchung	Probennummer	Enterobacteriaceae MPN (pro g)	Salmonellen (pro 25 g)
A	1	0	neg
	2	>14*)	neg
	3	>14*)	pos
	4	>14*)	neg
	5	0,45	neg
B	1	0	neg
	2	>140	pos
	3	0	neg
	4	2,0	neg

*) Berechnet aus untersuchten Probenmengen von 10 g/1 g / 0,1 g

Tabelle 20: Vorkommen von Enterobacteriaceae und Salmonellen in Proben, die im Rahmen einer Stufenkontrolle bei der Herstellung von Trockenkaseinat entnommen wurden

Probennummer	Enterobacteriaceae MPN (pro g)	Salmonellen (pro 25 g)
1	>140	neg
2	>140	neg
3	>140	neg
4	>140	pos

Tabelle 21: Vorkommen von Enterobacteriaceae und Salmonellen in Proben, die im Rahmen einer Stufenkontrolle bei der Herstellung eines Milch-Kakao-Pulvers entnommen wurden

Probe	Enterobacteriaceae MPN (pro g)	Salmonellen (pro 25 g)
1	>140	neg
2	0	neg
3	0	neg
4	9,5	neg
5	0	neg

Tabelle 22: Vorkommen von Enterobacteriaceae und Salmonellen in Umgebungsproben Trockenmilcherzeugnisse produzierender Betriebe (Trockenmaterial)

Probe	Enterobacteriaceae MPN (pro g)	Salmonellen (pro 25 g)
1	> 14 *)	pos
2	> 14 *)	pos
3	> 14 *)	neg
4	> 14 *)	neg
5	> 14 *)	neg
6	> 140	pos
7	> 140	neg
8	> 140	neg
9	> 140	neg
10	2	pos
11	2,5	neg
12	2	neg
13	1,5	neg
14	0	neg

*) Berechnet aus untersuchten Probenmengen von 10 g / 1 g / 0,1 g

Aus der Gegenüberstellung in Tabelle 23 geht hervor, daß ein Salmonella-Nachweis bei Enterobacteriaceae-MPN von sowohl 0,4/g als auch >140/g gelang. Andererseits gab es aber auch Proben (Produkte, Umgebung) mit >140 Enterobacteriaceae/g, bei denen sich in 25 g keine Salmonellen nachweisen ließen. Bei Betrachtung der Stichzahlen fällt auf, daß bei Salmonella-haltigen Proben zumindest einer der drei Ansätze à 1 g immer Enterobacteriaceae enthielt, während dies bei 0,1 g nur bei 9 Ansätzen zutraf. Noch schlechter waren die Beziehungen Salmonellen - Enterobacteriaceae bei den 0,01 g-Ansätzen.

Tabelle 23: Enterobacteriaceae-Gehalt (Stichzahl und MPN) in Salmonella-positiven Proben

MPN/g	Stichzahl	
0,4	100	Produktproben
0,4	100	
0,4	100	
0,9	100	
2,0	220	
>14	333*)	
>140	333	
>140	333	
>140	333	
2,0	220	Umgebungsproben
>14	333*)	
>14	333*)	
>140	333	

*) untersuchte Mengen: 10 g - 1 g - 0,1 g (jeweils dreifach)

Die bei der Untersuchung von nur 1 x 1 g auf Enterobacteriaceae und 1 x 25 g auf Salmonellen erzielten Ergebnisse sind in den Tabellen 24-27 wiedergegeben. Der zusammenfassenden Übersicht (Tab. 24) ist zu ent-

men, daß von 280 Produktproben 150 (53,6 %) Enterobacteriaceae (in 1 g) und 24 (8,6 %) Salmonellen (in 25 g) aufwiesen. In den Umgebungsproben war der Anteil der Enterobacteriaceae- bzw. Salmonella-haltigen Proben (87,5 bzw. 25 %) eindeutig höher. Im übrigen enthielten alle Proben, in denen Salmonellen nachgewiesen worden waren, auch Enterobacteriaceae.

Tabelle 24: Vorkommen von Enterobacteriaceae (untersuchte Menge: 1 g) und Salmonellen (untersuchte Menge: 25 g) in verschiedenen Milchprodukten und Umgebungsproben

Anzahl der untersuchten Proben und Art	Anzahl der Proben	
	Enterobacteriaceae-positiven	Salmonellen-positiven
280 (Produkte)	150	24*)
16 (Umgebungsproben)	14	4*)

*) Alle Proben waren auch Enterobacteriaceae-positiv.

Tabelle 25: Vorkommen von Enterobacteriaceae und Salmonellen in verschiedenen Lebensmittel-Trockenprodukten

Material	Anzahl d. untersuchten Proben	Enterobacteriaceae in 1 g	Salmonellen in 25 g
Fettkonzentrat (aus 50 % Fett und 50 % Magermilchpulver)	59	positiv 47 negativ 12	positiv - negativ 59
Trockenkaseinat	65*)	positiv 13 negativ 52	positiv 7**) negativ 58
Trockenkasein	63*)	positiv 28 negativ 35	positiv 13**) negativ 50
Magermilchpulver	16	positiv 16 negativ -	positiv - negativ 16
Gemisch aus Fett (40 %), Magermilch (30 %) und Stärkezucker (30 %)	8	positiv 8 negativ -	positiv - negativ 8
Käsepulver	3	positiv 3 negativ -	positiv - negativ 3
Kakaopulver	4	positiv - negativ 4	positiv - negativ -
Gemisch aus Kakaopulver (25 %) und Magermilchpulver (75 %)	35	positiv 19 negativ 16	positiv 4**) negativ 31
Gemisch aus Kakaopulver (30 %), Magermilchpulver (60 %) und Zucker (10 %)	4	positiv 4 negativ -	positiv - negativ 4

*) Proben jeweils einer Charge

**) auch Enterobacteriaceae-positiv

Tabelle 26: Vorkommen von Enterobacteriaceae und Salmonellen in Proben, die im Rahmen von Stufenkontrollen bei der Herstellung von Fettkonzentrat (50 %) in Pulverform entnommen wurden

Anzahl der untersuchten Proben	Enterobacteriaceae (in 1 g)		Salmonellen (in 25 g)	
18	positiv	12	positiv	-
	negativ	6	negativ	18

Tabelle 27: Vorkommen von Enterobacteriaceae und Salmonellen in Umgebungsproben (Trockenmilcherzeugnisse produzierender Betriebe (Trockenmaterial)

Anzahl der untersuchten Proben	Enterobacteriaceae (in 1 g)		Salmonellen (in 25 g)	
16	positiv	14	positiv	4*)
	negativ	2	negativ	12

*) auch Enterobacteriaceae-positiv

3.2 Sicherheit der Untersuchungen auf Salmonellen bei Prüfung von Sammelproben statt Einzelproben

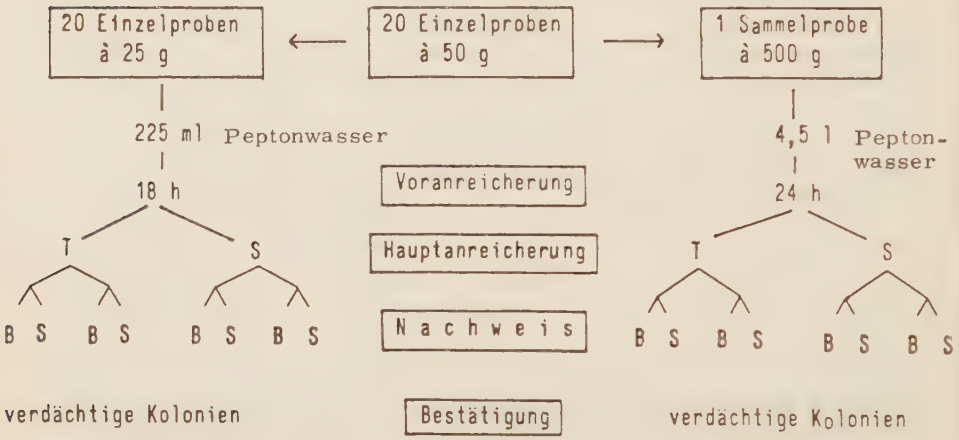
Im ersten Teil dieser Untersuchungen wurden uns zur Verfügung stehende, natürlich mit Salmonellen kontaminierte Trockenmilchprodukte eingesetzt. Da diese in nur begrenztem Umfang zur Verfügung standen, mußte in einem zweiten Versuchsabschnitt mit künstlich kontaminierten Produkten gearbeitet werden. In beiden Versuchsabschnitten wurde der Umfang der Sammelprobe auf 500 g - entsprechend 20 Einzelproben zu 25 g - begrenzt. Diese Begrenzung erfolgte, da im Routinelabor im allgemeinen keine Gefäße zur Verfügung stehen, die z.B. 1500 g des zu untersuchenden Materials und die hierfür notwendigen 13,5 l des Voranreicherungsmediums fassen. Außerdem sind auch meist die für derartig dimensionierte Gefäße erforderlichen Brutschränke nicht vorhanden.

3.2.1 Untersuchungen von Sammelproben aus natürlich kontaminierten Trockenmilchprodukten

3.2.1.1 Material und Methodik

Aus 60 Säcken einer Charge wurden jeweils 50 g Material (Kalium-Kaseinat oder Kasein) entnommen und nach sorgfältiger Mischung in zwei Portionen zu 25 g aufgeteilt (Abbildung 3). Die eine Portion wurde stets gesondert untersucht, die andere erst nach Vermischung mit weiteren 19 zu einer Sammelprobe. Infolgedessen wurden insgesamt drei Sammelproben gebildet. Die Einzelproben wurden nach dem unter 3.1.2.1 geschilderten Schema geprüft. Die Sammelproben wurden in einer 5 Liter fassenden Steilbrustflasche mit 4,5 l gepuffertem Peptonwasser vorangereichert. Um bei der sich ergebenden hohen Schicht die für eine Wiederbelebung subletal geschädigter Salmonellen erforderliche Sauerstoffversorgung zu gewährleisten, wurde die Inkubation unter Verwendung von Magnetrührern im Brutschrank durchgeführt. Dadurch kam auch das schlecht lösliche Kaseinat zur völligen Lösung. Die Bebrütungsdauer betrug 24 Std. (statt 18 Std. bei den Einzelproben). Der weitere

Abbildung 3: Nachweis von Salmonellen in Trockenmilchprodukten mittels Einzel- bzw. Sammelproben (Methodik)



Abkürzungen siehe Abbildung 1

Untersuchungsvorgang lief dann wie bei den Einzelproben ab (s.a. Abb. 1). Die Übertragung aus der Voranreicherung in mehrere parallele MK bzw. SEL-Hauptanreicherungen brachte in orientierenden Versuchen keine Vorteile und wurde deshalb nicht weiter fortgeführt.

3.2.1.2 Ergebnisse

Aus den Tabellen 28 und 29 geht hervor, daß der Nachweis bei den Sammelproben (20 Proben à 25 g) stets positiv ausfiel, wenn in einer oder mehreren der entsprechenden 20 Einzelproben Salmonellen gefunden wurden. Darüber hinaus war noch eine Sammelprobe (Tab. 28) positiv, obwohl bei keiner der zuzuordnenden 20 Einzelproben ein Salmonella-Nachweis gelungen war.

Ergänzend zu den qualitativen Untersuchungen der Einzel- bzw. Sammelproben wurde auch versucht, mittels MPN-Technik den Gehalt an Salmonellen bzw. Enterobacteriaceae in den beiden Produkten Kalium-Kaseinat bzw. Kasein quantitativ zu bestimmen.

Tabelle 28: Nachweis von Salmonellen in natürlich kontaminiertem Kaliumkaseinat mittels Einzelproben bzw. Sammelproben

Probe	Anzahl der Einzelproben		Sammelprobe (aus jeweils 20 Einzelproben)
	getestet	positiv	
A	20	0	negativ
	20	1	positiv
	20	4	positiv
B	20	0	negativ
	20	0	negativ
	20	2	positiv
C	20	0	negativ
	20	0	positiv !
	20	3	positiv
D	20	0	negativ
	20	2	positiv
	20	0	negativ

Hierbei wurden für die Enterobacteriaceae MPN-Keimzahlen von über 140/g ermittelt, für die Salmonellen MPN-Werte von 4 - 90 (Kasei nat) bzw. 9 - 95 (Kasein) pro 500 g. Die Aussagekraft der Untersuchungsergebnisse bezüglich der Eignung von Sammelproben anstelle von Einzelproben zum Salmonella-Nachweis war insofern noch nicht voll befriedigend, als keine Proben im kritischen Bereich von ca. 2 - 5 Salmonellen/ 500 g Lebensmittel getestet werden konnten. Dieser Bereich ist insofern von besonderer Bedeutung, als entsprechend dem FOSTER-Plan davon ausgegangen wird, daß nicht mehr als 1 Salmonelle pro 500 g vorhanden ist, wenn die Untersuchung von 60 Einzelproben à 25 g bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von 5 % negativ ausfällt. Allerdings ist auch zu berücksichtigen, daß dieser Wert statistisch errechnet wurde.

Tabelle 29: Nachweis von Salmonellen in natürlich kontaminiertem Kasein mittels Einzelproben bzw. Sammelproben

Probe	Anzahl der Einzelproben		Sammelprobe (aus jeweils 20 Einzelproben)
	getestet	positiv	
A	20	4	positiv
	20	6	positiv
	20	8	positiv
B	20	5	positiv
	20	8	positiv
	20	4	positiv
C	20	4	positiv
	20	6	positiv
	20	8	positiv
D	20	5	positiv
	20	12	positiv
	20	4	positiv
E	20	4	positiv
	20	6	positiv
	20	2	positiv
F	20	5	positiv
	20	3	positiv
	20	5	positiv

3.2.2 Untersuchung von Sammelproben aus künstlich kontaminierten Trockenmilchprodukten

3.2.2.1 Material und Methodik

Aufgrund der nur in beschränktem Umfang zur Verfügung stehenden natürlich kontaminierten Trockenmilchprodukte wurde mit künstlich kontaminiertem Material gearbeitet.

Zunächst wurden nach einem von EDEL und KAMPELMACHER (1973)

beschriebenen Verfahren Salmonellen der Serovaren braenderup, panama und senftenberg subletal geschädigt. Hierzu wurde 1 l einer 24 Std. bei 37°C in Nutrient Broth (Fa. Oxoid) bebrüteten Kultur bei 10 000 Umdrehungen/min 15 min lang zentrifugiert. Das Sediment wurde in 1 l Kondensmilch (10 % Fett, 23 % fettfreie Trockenmasse) suspendiert und bei 18 000 Umdrehungen/min für 15 min zentrifugiert. Sediment und Fettüberstand wurden in sterilen Glaspetrischalen mehrere Tage bei 43°C im Brutschrank unter wiederholtem Ablösen mit dem Spatel getrocknet, bevor das trockene Material im Mörser fein zermahlen wurde. Die darin enthaltenen Salmonellen wurden dann als subletal geschädigt betrachtet, wenn ein Nachweis nur über Voranreicherung und Hauptanreicherung, nicht aber direkt über Hauptanreicherung (MK) möglich war.

Der Gehalt an subletal geschädigten Salmonellen in dem trockenen Material wurde abschließend mittels MPN-Technik bestimmt. Entsprechend den erzielten Resultaten wurde das Material dann jeweils vor Versuchsbeginn in gepuffertem Peptonwasser in Zehnerstufen verdünnt, um den Sammelproben bei der Vermischung mit dem Voranreicherungsmedium Salmonellen in geringen definierten Mengen zusetzen zu können. Während anfänglich auf entsprechende Versuche an Einzelproben verzichtet wurde, wurde später - insbesondere wenn nur mit ganz geringen Mengen an Salmonellen kontaminiert wurde - die der Sammelprobe (500 g) hinzugefügte Menge an Salmonellen auch auf 20 Einzelproben zu 25 g verteilt.

Die eigentliche Untersuchung auf Salmonellen erfolgte entsprechend jener bei den natürlich kontaminierten Proben. Zur Kontrolle, ob in den jeweiligen zur Kontamination verwendeten Verdünnungsstufen lebensfähige Salmonellen vorhanden waren, wurden die betreffenden sowie die jeweils vorhergehenden als auch folgenden Verdünnungsstufen auf die tatsächliche Anwesenheit von Salmonellen untersucht.

Als Untersuchungsmaterial wurden verwendet: Molkenpulver, Magermilchpulver, Vollmilchpulver und Kalium-Kaseinat. Alle Materialien wurden in Vorversuchen über mehrere Einzelproben à 25 g (je nach zur

Verfügung stehender Gesamtmenge) auf Freiheit von Salmonellen geprüft. Die Gehalte an Gesamt-Enterobacteriaceae betrugen im Kalium-Kaseinat mehr als 140 Keime/g, im Molkenpulver 0 - 0,4 /g, im Vollmilchpulver 0,4/g und im Magermilchpulver 0/g.

3.2.2.2 Ergebnisse

In Tabelle 30 sind die positiven Ergebnisse bei Untersuchung von Sammelproben im einzelnen aufgeführt. Neben der höchstwahrscheinlichen Keimzahl (MPN) für die pro 500 g zugesetzten Salmonellen sind in Spalte 4 der Tabelle auch die oberen und unteren Vertrauensgrenzen der MPN angegeben. Diese Grenzen wurden nach der bei HARRIGAN und McCANCE (1976) für drei Parallelansätze wiedergegebenen Formel von COCHRAN berechnet:

$$\frac{MPN}{4,68} \text{ bis } MPN \times 4,68$$

Wie aus der Tabelle 30 ersichtlich wird, verlief der Salmonella-Nachweis positiv bei 17 Sammelproben, die entsprechend den Ergebnissen der MPN-Bestimmung mit 3 - 150 subletal geschädigten Salmonellen künstlich kontaminiert worden waren. Selbst wenn man hinsichtlich der MPN-Werte von den ungünstigsten Zahlen (obere Vertrauensgrenze) ausgeht, ließen sich somit Sammelproben mit mindestens 15 Salmonellen/ 500 g sicher erfassen. Wenn man dagegen auch die untere Vertrauensgrenze berücksichtigen würde, waren Salmonellen sogar in 3 Proben (Molkenpulver, Kalium-Kaseinat) nachweisbar, denen entsprechend den Ergebnissen für die MPN ca. 1 Salmonelle/500 g hinzugesetzt worden war. Auffällige Unterschiede zwischen den verwendeten Materialien bzw. Serovaren ließen sich nicht beobachten.

Andererseits verlief bei 5 Sammelproben, denen laut MPN-Bestimmung 1,5 bis 15 Salmonellen/500 g zugegeben gewesen sein sollten, der Salmonella-Nachweis negativ (Tab. 31).

Tabelle 30: Positive Ergebnisse beim Nachweis von Salmonellen in künstlich kontaminierten Trockenmilchprodukten über Sammelproben

Material	Serovar	MPN-Keimzahl zugesetzter Salmonellen/500 g	Vertrauensgrenzen (95%) untere	obere
Molkenpulver	S. braenderup	45	9,62	210,60
	"	4,5	0,96	21,06
Kalium-Kaseinat	S. braenderup	30	6,41	140,40
	"	3	0,64	14,04
	"	3	0,64	14,04
Magermilchpulver	S. panama	150	32,05	702,00
	S. braenderup	135	28,85	631,80
	S. panama	135	28,85	631,80
	S. braenderup	45	9,62	210,60
	S. senftenberg	30	6,41	140,40
Vollmilchpulver	S. panama	150	32,05	702,00
	S. panama	135	28,85	631,80
	S. braenderup	95	20,30	444,60
	S. senftenberg	33	7,05	154,44
	S. panama	28	5,98	131,04
	S. senftenberg	28	5,98	131,04
	S. panama	15	3,21	70,20

Tabelle 31: Negative Ergebnisse beim Nachweis von Salmonellen in künstlich kontaminierten Trockenmilchprodukten über Sammelproben

Material	Serovar	MPN-Keimzahl vermutlich zugesetzter Salmonellen/500 g	Vertrauensgrenzen (95%) untere	obere
Magermilchpulver	S. braenderup	15	3,21	70,20
	S. braenderup	13,5	2,88	63,18
	S. senftenberg	1,5	0,32	7,02
Vollmilchpulver	S. panama	15	3,21	70,20
	S. braenderup	9,5	2,03	44,46

Ob es sich bei diesen Ergebnissen um "falsch-negative" (kein Nachweis von Salmonellen trotz Anwesenheit in den Produkten) oder "echt-negative" (kein Nachweis von Salmonellen, da keine vermehrungsfähigen Keime in das Produkt übertragen wurden) Resultate handelte, war nicht mit Sicherheit zu klären. Für die zweite Vermutung sprach allerdings, daß bei der Kontrolluntersuchung der Verdünnungen Salmonellen nur in der Stufe registriert werden konnten, von der die Übertragung erfolgte, nicht aber mehr in der nächsten Verdünnungsstufe. Ein weiteres Indiz für diese Vermutung war die Tatsache, daß bei anschließenden Versuchen mit 20 Einzelproben à 25 g, denen in vergleichbarer Weise Salmonellen (S. senftenberg) in geringer Menge zugesetzt worden waren (MPN: 4,5/ 500 g), ebenfalls kein positiver Salmonella-Nachweis gelang.

Aufgrund dieser Resultate wurden bei den darauffolgenden Versuchsreihen jeweils 500 g des Materials (Sammelprobe) bzw. 20 mal 25 g des Materials (Einzelproben) in gleicher Weise mit subletal geschädigten Salmonellen (MPN: 5,5 - 9,5) künstlich kontaminiert. Die dabei erzielten Ergebnisse sind in der Tabelle 32 zusammengefaßt. In 7 der 12 Versuchsreihen waren sowohl in der Sammelprobe als auch in mindestens einer der Einzelproben Salmonellen nachzuweisen. In zwei Versuchsreihen (Vollmilchpulver, Magermilchpulver) erbrachten die Sammelproben jeweils ein positives Ergebnis, nicht aber die Einzelproben, in zwei weiteren Versuchsreihen wurden die umgekehrten Resultate registriert (Molkenpulver und Magermilchpulver jeweils eine positive Einzelprobe, Sammelprobe negativ). In einer Versuchsreihe schließlich waren Salmonellen weder in der Sammelprobe noch in einer der 20 Einzelproben feststellbar.

Tabelle 32: Proben mit nachgewiesenen Salmonellen bei künstlich kontaminierten Trockenmilchprodukten über Sammelproben à 500 g und 20 Einzelproben zu je 25 g

Material	Serovar	MPN-Keimzahl zugesetzter Salmonellen/500 g	Vertrauensgrenzen (95 %) untere	obere	Sammelprobe	Anzahl positiver Einzelproben
Molkenpulver	S. panama	9,5	2,03	44,46	pos	2
	"	9,5	2,03	44,46	pos	3
	"	9,5	2,03	44,46	neg	1
	"	7,5	1,60	35,10	neg	0
Magermilchpulver	S. senftenberg	5,5 x)	1,18	25,74	pos	2
	"	5,5 x)	1,18	25,74	pos	0
	"	5,5 x)	1,18	25,74	pos	1
	"	5,5 x)	1,18	25,74	neg	1
Vollmilchpulver	S. senftenberg	5,5 x)	1,18	25,74	pos	0
	"	5,5 x)	1,18	25,74	pos	1
	"	5,5 x)	1,18	25,74	pos	1
	"	5,5 x)	1,18	25,74	pos	1

x) Mittelwert aus 3 parallelen MPN-Bestimmungen.

4. Besprechung der Ergebnisse und Diskussion

Unter den durch Bakterien hervorgerufenen Lebensmittelvergiftungen stehen die Salmonellosen weltweit i.d.R. an erster Stelle. Obwohl nach SILLIKER (1980) Milchprodukte insgesamt in den Jahren 1966 bis 1975 nur mit 4 % an 500 Salmonelloseausbrüchen in den USA beteiligt waren, liegt im Vorkommen von Salmonellen in Trockenmilchprodukten eine besondere Gefahr, da diese oft als Heilnahrung gerade für besonders gefährdete Verbrauchergruppen (Kranke, Kleinkinder, Senioren) dienen. Um diesen Risiken weitestgehend vorzubeugen, sollte der Hersteller dafür sorgen, daß derartige Produkte stets auch einer mikrobiologischen Untersuchung auf Salmonellen unterworfen werden. Da aus naheliegenden Gründen nicht die gesamte Produktion auf Salmonellen untersucht werden kann, muß man sich auf eine Qualitätskontrolle der einzelnen Herstellungschargen nur auf Stichprobenbasis beschränken und in Kauf nehmen, daß eine absolute Abwesenheit von Salmonellen nicht garantiert werden kann. Es kann aber davon ausgegangen werden, daß bei Einhaltung geeigneter Stichproben - bzw. Prüfpläne - und Anwendung geeigneter Untersuchungsverfahren - eine Aussage über die wahrscheinliche Beschaffenheit der gesamten Charge in bezug auf die An- bzw. Abwesenheit von Salmonellen in einer bestimmten Produktmenge möglich ist. Entsprechend dem sog. FOSTER-Plan (FOSTER, 1971), der wegen seiner präzisen statistischen Basis breite Aufmerksamkeit gefunden hat (REUSSE und GEISTER, 1978), kann z.B. mit 95%iger Sicherheit geschlossen werden, daß in 500 g des Produktes nicht mehr als 1 Salmonelle enthalten ist, sofern die Untersuchung von 60 Einzelproben dieses Produktes - zu jeweils 25 g - negativ verlaufen ist. (Bei Tolerierung dieses geringen Salmonella-Gehaltes wird mit ziemlicher Sicherheit auch bei dem o.a. stärker gefährdeten Personenkreis noch keine Erkrankung ausgelöst). Da solche Untersuchungen aber mit einem sehr hohen Arbeitsaufwand verbunden sind, wurden von einigen Autoren (GABIS und SILLIKER, 1974; HUHTANEN et al., 1972; NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE - NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 1969; PRICE et al., 1972; SILLIKER

und GABIS, 1973) Überlegungen angestellt, ob und inwieweit durch Untersuchung von wenigen durch "Poolen" (Zusammenfügen von Einzelproben) gewonnenen Sammelproben statt vieler Einzelproben eine Vereinfachung möglich ist. Als Alternative zur Untersuchung auf Salmonellen gemäß dem FOSTER-Plan wurde auch die Möglichkeit erwogen (DRION und MOSSEL, 1972, 1977; MOSSEL, 1964, 1967; SILLIKER und GABIS, 1976), Lebensmittel auf die Anwesenheit von Enterobacteriaceae als Index-Mikroorganismen (INGRAM, 1977) zu untersuchen und aus den Ergebnissen Rückschlüsse auf die mögliche Anwesenheit von Salmonellen zu ziehen. Beide Vorschläge wurden bisher bezüglich ihrer Eignung für Trockenmilchprodukte noch nicht umfassend geprüft, so daß das Problem im Rahmen dieser Arbeit durch entsprechende Untersuchungen an Produkten unterschiedlicher Herkunft bzw. an künstlich mit Salmonellen kontaminiertem Material abgeklärt werden sollte.

Voraussetzung für eine allgemeingültige Beantwortung dieser Fragen ist die Anwendung von Untersuchungsmethoden, die nach dem augenblicklichen Stand der Erkenntnisse als optimal gelten. Unumstritten ist heutzutage die Tatsache, daß bei Produkten, in denen mit der Anwesenheit subletal geschädigter Salmonellen zu rechnen ist (z.B. Trockenmilchprodukte), der Untersuchungsgang aus folgenden Einzelschritten bestehen muß: Voranreicherung mit einem nicht-selektiven flüssigen Medium - Hauptanreicherung mit flüssigen selektiven Medien - Nachweis mit festen selektiven Medien - Bestätigung verdächtiger Kolonien mit biochemischen und serologischen Tests. Hinsichtlich der Einzelheiten zu den für diese Zwecke empfohlenen Nährmedien und Methoden kann auf die umfangreichen Publikationen von McCOY (1962), LITCHFIELD (1973), FAGERBERG und AVENS (1976) und HARVEY und PRICE (1979) verwiesen werden. Für die eigenen Untersuchungen dienten die Untersuchungsvorschriften in den Entwürfen der DIN-Norm 10 181 (Nachweis von Salmonellen in Milch, Milchprodukten und Speiseeis) bzw. IMV-Norm (Nachweis von Salmonellen in Milchprodukten) sowie in der Eiprodukte-VO als Leitfaden. Vor Beginn der eigentlichen Untersuchungen waren jedoch

einige Modellversuche erforderlich, um sich aus den erwähnten drei Vorschriften bzw. aus der Literatur ergebende Unklarheiten zu beseitigen.

Die in der Literatur zu findenden Angaben bezüglich der Dauer der Voranreicherung differieren erheblich (siehe auch S. 30 Tabelle 12). Dies kommt auch darin zum Ausdruck, daß in der DIN-Norm (Entwurf Juni 1979) von mindestens 6 - 8 Stunden ausgegangen wird, in der IMV-Norm (Entwurf Januar 1979) von 20 Stunden und in der Eiprodukte-VO von 18 Stunden. Nachdem in eigenen Untersuchungen die Feststellung getroffen wurde, daß eine 6stündige Inkubation im Gegensatz zu der längeren Periode wiederholt zu falsch-negativen Resultaten führte, wurde in den Hauptversuchen eine 18stündige Bebrütungsdauer für die Einzelproben gewählt. Erwartungsgemäß reichte auch bei den aus 20 Einzelproben zu 25 g zusammengesetzten Sammelproben eine 6- bis 8stündige Inkubation nicht aus: Aus 8 salmonellahaltigen Sammelproben konnten bei dieser Inkubationszeit keine Salmonellen isoliert werden, während bei 24-stündiger Voranreicherung der Nachweis bei allen Proben gelang. Aufgrund dieser Resultate wurde später bei allen Sammelproben eine Voranreicherungsperiode von 24 Std. eingehalten.

REUSSE (1978) weist auf die Notwendigkeit einer ausreichenden Belüftung der Voranreicherung hin, da z.B. die Nachweissicherheit bei hoher gegenüber der bei flacher Schicht deutlich gemindert ist. Da beim Ansatz der Sammelproben (500 g in 4,5 l Medium) in 5 l fassenden Steilbrustflaschen sich bei den eigenen Experimenten zwangsläufig eine hohe Schicht ergab, wurde dieser Nachteil durch Belüftung auch der tieferen Schichten des Mediums mittels eines sich im Brutschrank befindlichen Magnetrührers ausgeschaltet. Eine ständige Durchmischung war auch schon deshalb unumgänglich, weil sich alle Probenmaterialien in den verwendeten Mengen (500 g) relativ schlecht lösten. Eine vollständige Lösung des Kaseins und Kalzium-Kaseinats war überhaupt nur durch längere Bewegung (bei Einzelproben im Schüttelbrutschrank, bei Sammelproben mit Magnetrührgerät) erreichbar.

Der in dem Norm-Entwurf des Internationalen Milchwirtschaftsverbandes (IMV) bei fetthaltigen Proben empfohlene Zusatz von Tergitol Nr. 7 zur Voranreicherung erbrachte bei Fettkonzentrat mit 50 % Fettgehalt und anderen fetthaltigen Produkten nur bei verkürzter Bebrütungsdauer (6 Std.) etwas bessere Ergebnisse als das Tergitol-freie Anreicherungsmedium, nicht aber bei 18stündiger Inkubation. Eine für Salmonellen toxische Wirkung des Tergitol war nicht gegeben, da auch nach der längeren Bebrütung ein Nachweis geringer Ausgangskontaminationen in gleicher Weise wie in der Kontrolle ohne Tergitol möglich war. Da bei 18stündiger Inkubation kein Vorteil zu verzeichnen war, wurde in den Hauptversuchen auf den Zusatz von Tergitol bei fetthaltigen Produkten verzichtet. Im übrigen wird aufgrund neuerer Untersuchungen auch von D'AOUST (1981) ein derartiger Zusatz (3 % Endkonzentration) als nicht effektiv abgelehnt.

Zwar haben sich als Medien für die Hauptanreicherung durchwegs solche mit Tetrathionat und Selenit als wesentlichem Bestandteil durchgesetzt, doch sind immer wieder in der Literatur Hinweise erschienen, daß die Salmonella-Anreicherungsbouillon nach RAPPAPORT (RAPPAPORT et al., 1956) bzw. deren Modifikationen (HOFER, 1969; VASSILIADIS et al., 1970; 1976) diesen Selektivanreicherungen überlegen seien (COLLARD und UNWIN, 1958; HOOPER und JENKINS, 1965; VASSILIADIS et al., 1974; 1978a, b; 1979; IVESON und MACKAY-SCOLLAY, 1972; TRICHOPOULOS et al., 1975; HARVEY et al., 1979). So ist z.B. bekannt, daß Probleme beim Nachweis von S. cholerae-suis mit Tetrathionat- bzw. Selenit-Bouillon auftreten können (HARVEY und PRICE, 1979). CARLSON und SNOEYENBOS (1974) konnten neben dieser Serovar auch S. cholerae-suis var. kunzendorf, S. paratyphi A und S. typhisuis, S. dublin und S. gallinarum - alles relativ wirtspezifische Serovaren - mit den beiden Selektivanreicherungen nicht nachweisen. Allerdings benutzten die Autoren ein Selenit-Brillantgrün-Sulfa-Nährmedium, das sich nach ihren Angaben allgemein besser als Selenit F und Selenit Cystin zum Nachweis von Salmonellen bewährt hatte. Dies ist möglicherweise auch der Grund für die Schwierigkeit

beim Nachweis von S.dublin, deren Isolierung über Selenit F nach HARVEY und PRICE (1975) mit gutem Erfolg möglich ist. Das RAPPAPORT-Medium hat außerdem bereits bei gleicher Leistungsfähigkeit gewisse Vorteile gegenüber der Selenit-Bouillon, die z.B. auch nicht in der Eiprodukte-VO als Medium genannt wird. So wird zum einen eine Gefährdung des Laborpersonals durch die möglichen teratogenen Eigenschaften des Selenit (OXOID, 1977) vermieden, zum anderen ist eine bei häufigen Untersuchungen auf Salmonellen Vorteile bietende Lagerung aufgrund der Hitzesterilisation im Autoklaven im Gegensatz zur Selenit-Bouillon (10 Min. Erhitzung im Dampftopf) möglich. Eigene vergleichende Untersuchungen mit dem RAPPAPORT-Medium in seiner ursprünglich beschriebenen Zusammensetzung und den beiden anderen Nährböden (Tetrathionat-Brillantgrün-Galle-Bouillon nach MULLER-KAUFFMANN (modifiziert) und Selenit-Bouillon nach LEIFSON (modifiziert)) erbrachten bei den untersuchten Trockenmilchprodukten jedoch keine Überlegenheit des RAPPAPORT-Mediums, so daß auf dieses Medium in den Hauptversuchen verzichtet wurde.

Da im FOSTER-Plan (FOSTER, 1971) aufgrund mathematisch-statistischer Überlegungen davon ausgegangen wird, daß nach Untersuchung von 60 Proben à 25g für den Verbraucher bei negativem Ergebnis nur noch ein Risiko von 5% besteht, daß mehr als 1 Salmonelle in 500 g des betreffenden Lebensmittels enthalten sind, war es im Hinblick auf die Untersuchung von Sammelproben auch von Bedeutung, eine Aussage über den mit geeigneten Untersuchungsverfahren nachweisbaren Gehalt an Salmonellen pro 500 g des Materials machen zu können. Zu diesem Zweck wurde die aufgrund wahrscheinlichkeitstheoretischer Betrachtungen entwickelte MPN-Technik (THOMAS, 1970; De MAN, 1975; OBLINGER und KOBURGER, 1975; MAYOU, 1976) angewendet, die z.B. LiCARI und POTTER (1970a) sowie RAY et al. (1971 d) bei der Untersuchung von Trockenmilch auf Salmonellen einsetzten. Dabei zeigte sich im übrigen bei den natürlich kontaminierten Materialien, daß in mehreren Parallelbestimmungen die ermittelten Werte z.B. zwischen 4 und 90 (Kalium-Kaseinat) bzw.

9 und 95 (Kasein) pro 500 g schwankten. Dies ist vermutlich auf die natürlicherweise heterogene Verteilung der Salmonellen im Material (VAN SCHOTHORST et al., 1966) zurückzuführen, zumal bei entsprechenden Untersuchungen von selbst hergestellten und subletal geschädigte Salmonellen enthaltenden Materialien diese Unterschiede zwischen Paralleluntersuchungen nicht auftraten. Auf den systematischen Unsicherheitsfaktor, mit dem der FOSTER-Plan somit behaftet ist (da eine sichere statistische Basis nur gegeben ist, wenn die Keime im Medium homogen verteilt sind (WEISS et al., 1977; REUSSE und GEISTER, 1978), soll hier jedoch nicht näher eingegangen werden.

Die im ersten Versuchsabschnitt mit natürlich kontaminierten Proben vorgenommenen Vergleiche von 600 Einzelproben und aus jeweils 20 Einzelproben bestehenden 30 Sammelproben ließen keine Überlegenheit der konventionellen Technik (Einzelprobenuntersuchung) erkennen. Es war im Gegenteil sogar eine Sammelprobe positiv, obwohl bei keiner der ihr zuzuordnenden 20 Einzelproben ein Salmonella-Nachweis gelang. Die Aussagekraft dieser Experimente wird allerdings dadurch etwas eingeschränkt, daß die Proben relativ hohe Salmonella-Gehalte (bis zu 95 pro 500 g entsprechend den Ergebnissen mit der MPN-Technik) aufwiesen und keine Proben mit ca. 1 bis 3 Salmonellen pro 500 g zur Verfügung standen. Dieser Bereich ist - wie bereits oben angegeben wurde - aber im Hinblick auf die Grenzwerte des FOSTER-Plans von größerem Interesse. Produkte wurden anschließend künstlich mit entsprechend einer von EDEL und KAMPELMACHER (1973) beschriebenen Technik subletal geschädigten Salmonellen (Serovaren: S. panama, S. braenderup, S. senftenberg) kontaminiert. Bei 17 von 22 solcher Sammelproben à 500 g, die den Ergebnissen der MPN-Bestimmung zufolge mit 3 bis 150 Salmonellen kontaminiert worden waren, verlief der Salmonella-Nachweis positiv. Selbst wenn man hinsichtlich der MPN-Werte von den ungünstigsten Zahlen (obere Vertrauensgrenze) ausgeht, ließen sich somit Sammelproben mit mindestens 15 Salmonellen/500 g sicher erfassen. Wenn man dagegen auch die untere Vertrauensgrenze berücksichtigen würde, waren Salmonellen sogar in

drei Proben (Molkenpulver, Kalium-Kaseinat) nachweisbar, denen entsprechend den Ergebnissen für MPN ca. 1 Salmonelle/500 g zugesetzt worden war. Auffällige Unterschiede zwischen den verwendeten Materialien bzw. Serovaren ließen sich nicht beobachten. Bei weiteren 5 Sammelproben, in denen laut MPN-Bestimmung 1,5 bis 15 Salmonellen/500 g enthalten sein sollten, ließen sich diese Keime nicht nachweisen. Hieraus darf allerdings nicht geschlossen werden, daß es sich um "falsch-negative" Resultate (kein Nachweis von Salmonellen trotz Anwesenheit in den Produkten) handelte. Es ist vielmehr in Betracht zu ziehen, daß die Ergebnisse zwangsläufig negativ waren, da keine vermehrungsfähigen Keime in das Produkt übertragen wurden. Für diese Vermutung spricht insbesondere, daß bei der Kontrolle der für die Beimpfung des Materials verwendeten Verdünnungen Salmonellen nur in der Stufe registriert werden konnten, von der die Übertragung erfolgte, nicht aber mehr in der nächsten Verdünnungsstufe. Ein weiteres Indiz für diese Vermutung ist die Tatsache, daß bei anschließenden Versuchen mit 20 Einzelproben à 25 g, denen in vergleichbarer Weise S. senftenberg in geringer Menge zugesetzt worden war (MPN: 4,5/500 g), ebenfalls kein positiver Salmonella-Nachweis gelang bzw. in zusätzlichen Versuchsreihen mit Sammelproben bzw. Einzelproben nur zum Teil Übereinstimmung gegeben war. So waren zwar in 7 von 12 Versuchsreihen sowohl in der Sammelprobe (500 g) als auch in mindestens einer der 20 Einzelproben Salmonellen nachzuweisen, doch gelang in einer Versuchsreihe weder mit der Sammelprobe noch der Einzelprobe der Salmonellen-Nachweis. In zwei Versuchsreihen (Vollmilchpulver, Magermilchpulver) schließlich erbrachten die Sammelproben jeweils ein positives Ergebnis, nicht aber die Einzelproben, in zwei weiteren Versuchsreihen wurden die umgekehrten Resultate registriert (Molkenpulver und Magermilchpulver jeweils eine positive Einzelprobe, Sammelprobe negativ).

Da bisher keine Verfahren zur Verfügung stehen, die die sichere Übertragung von 1 Salmonelle erlauben, ist eine Überprüfung der oben aufgestellten Theorie bezüglich der negativen Resultate nicht möglich. Trotz-

dem kann aufgrund des Vergleiches von Einzel- und Sammelproben (500 g) die Schlußfolgerung gezogen werden, daß auch bei geringen, in der Nähe des Grenzwertes für Lebensmittel der Risikokategorie I liegenden Salmonella-Gehalten die Einzelprobenuntersuchung der Sammelprobenuntersuchung nicht überlegen ist.

Die Ergebnisse der eigenen Untersuchungen decken sich somit mit denen von SILLIKER und GABIS (1973), die bei ihren Untersuchungen ebenfalls etwa eine Salmonelle (geschätzt)/500 g in Sammelproben nachweisen konnten. Die ebenfalls von diesen Autoren mit Erfolg durchgeführte Prüfung von Sammelproben zu 1500 g dürfte wegen der hierfür erforderlichen extrem großen Gefäße (Menge des Voranreicherungsmediums: 13,5 l) und Bruträume für die überwiegende Zahl der Laboratorien weniger praktikabel sein, deutet aber an, daß auch aus Sammelproben solchen Umfangs der Nachweis von Salmonellen in geringer Anzahl möglich ist. Ein Vergleich der eigenen Ergebnisse mit jenen von HUHTANEN et al. (1972) und PRICE et al. (1972) stößt insofern auf Schwierigkeiten, als die Autoren einerseits zu entsprechenden Ergebnissen kamen, andererseits aber eine andere Methodik anwendeten. Die Vermutung von SCHUBERT (1977/78), daß die Untersuchung von Sammelproben mit dem Nachteil behaftet sein könne, daß eventuell anwesende Salmonellen von der in weitaus größerer Zahl vorhandenen Begleitflora bei der Voranreicherung überwuchert würden, trifft offensichtlich nicht bzw. nur in Ausnahmefällen zu. Zumindest bei Trockenmilchprodukten mit einer Enterobacteriaceae-MPN von über 140/g und einer Salmonella-MPN von 3/500 g z.B. im Fall des künstlich kontaminierten Kalium-Kaseinates konnte dies ebensowenig beobachtet werden wie von anderen Autoren.

Aufgrund dieser Daten kann somit ein Zusammenfügen ("Poolen") von Einzelproben zu Sammelproben bei der Untersuchung von Trockenmilchprodukten auf Salmonellen ohne Verlust in der Nachweissicherheit empfohlen werden.

Als Alternative zur Untersuchung von Sammelproben auf Salmonellen (statt Einzelproben) wurde - wie bereits erwähnt - von einigen Autoren

(siehe Seite 38) auch die Möglichkeit diskutiert, bei hitzebehandelten Lebensmitteln Einzelproben auf die Anwesenheit der gesamten Enterobacteriaceae-Flora zu prüfen und das Vorkommen von Enterobacteriaceae in diesen Proben als Hinweis auf die mögliche Anwesenheit von Salmonellen in der betreffenden Charge zu werten. Der Vorteil eines solchen Enterobacteriaceae-Nachweises wird u.a. darin gesehen, daß erheblich geringere Probenmengen untersucht werden müßten als beim Salmonella-Nachweis (da die letztgenannten Keime nur einen geringen Anteil der Gesamt-Enterobacteriaceae ausmachen). Wenn z.B. in 2 bzw. sogar 1 Probe(n) zu 1 Gramm keine Enterobacteriaceae vorhanden sind, soll den Angaben von DRION und MOSSEL (1972 und 1977) zufolge die gleiche Wahrscheinlichkeit gegeben sein wie bei der direkten Untersuchung von 60 Einzelproben à 25 g auf Salmonellen und negativem Ergebnis, daß in 500 g des Produktes nicht mehr als 1 Salmonelle enthalten ist. Um zu prüfen, inwieweit dies auch für Trockenmilchprodukte zutrifft, wurden auch orientierende Untersuchungen in dieser Hinsicht durchgeführt. Der Nachweis der Enterobacteriaceae erfolgte dabei in vier Schritten: Voranreicherung mit einem nichtselektiven Medium, Hauptanreicherung mit einem flüssigen Selektivmedium, Nachweis mit festem Selektivmedium - Bestätigung mit biochemischen Tests. Die Voranreicherung wurde - anders als in der Eiprodukte-VO, aber (abgesehen von den Medien) wie beim Salmonella-Nachweis ebenfalls durchgeführt, da von einer subletalen Schädigung auch der Enterobacteriaceae auszugehen ist. Die von PIETZSCH und MULINDWA (1978) beschriebene Möglichkeit, den Nachweis von Salmonellen und Enterobacteriaceae kostensparend in einem Untersuchungsgang zu kombinieren und auf die Hauptanreicherung ganz zu verzichten, wurde anfänglich parallel zur konventionellen, durch die Voranreicherung ergänzte Technik auf ihre Eignung geprüft. Hierbei wird aus der Voranreicherung simultan auf Violet-Red-Bile-Agar mit 1 % Lactose (Salmonellen) bzw. Violet-Red-Bile-Agar mit 1 % Dextrose (Enterobacteriaceae) subkultiviert. Dieses Verfahren erbrachte aber bei insgesamt 13 Proben bezüglich der Salmonellen nur negative (statt vier positive) und bezüglich der

Enterobacteriaceae nur zwei (statt elf) positive Resultate. Da PIETZSCH und MULINDWA angeben, daß das Verfahren bei keimarmem Material sehr gut geeignet ist, dürfte das schlechte Ergebnis bei den eigenen Untersuchungen mit hohen Keimgehalten im verwendeten Untersuchungsmaterial zusammenhängen. Für die weiteren Untersuchungen wurde diese Methodik daher nicht mehr berücksichtigt.

In den eigenen Experimenten - allerdings an begrenztem Material - konnten die auf statistischen Berechnungen fußenden Angaben von DRION und MOSSEL (1972 und 1977) bezüglich der Übereinstimmung von Salmonella-Nachweis (60 Proben à 25 g) und Enterobacteriaceae-Nachweis (1 x 1 Gramm oder 2 x 1 Gramm) für die geringere Produktmenge von 1 Gramm nicht und für jene von 2 Gramm nur mit Einschränkungen bestätigt werden. So verlief der Salmonella-Nachweis bei sieben Proben einer Charge Trockenkaseinat bzw. bei 13 Proben einer Charge Trockenkasein positiv, ohne daß der Enterobacteriaceae-Nachweis in 1 g bzw. 2 x 1 g dieser Produkte gelang. In ergänzenden Experimenten stellte sich dann heraus, daß beim Trockenkaseinat durchschnittlich nur aus jeder fünften Probe à 1 g Enterobacteriaceae isoliert werden konnten, beim etwa doppelt so stark mit Salmonellen kontaminierten Trockenkasein durchschnittlich aus jeder zweiten bzw. dritten Produktprobe. Auch bei der von DRION und MOSSEL (1977) als zusätzliches Beispiel aufgeführten weniger strengen Anforderung (eine Abwesenheit von Salmonellen in 50 g Material ist als gegeben anzusehen, wenn in zwei Proben à 0,03 g keine Enterobacteriaceae nachgewiesen werden können) war in den eigenen Versuchen wiederholt keine Übereinstimmung zwischen den Ergebnissen für Enterobacteriaceae (negativ) und Salmonellen (positiv) zu registrieren. Die Resultate stehen somit im Widerspruch zu jenen von DRION und MOSSEL (1977), die sich auf Untersuchungen der Jahre 1950 bis 1976 beziehen und in Tabelle 33 zusammengefaßt sind. Allerdings hatten auch DRION und MOSSEL (1977) darauf verwiesen, daß in einzelnen Fällen die Produkte, die aufgrund des positiven Ergebnisses bei der Untersuchung auf Salmonellen zu beanstan-

Tabelle 33: Resultate der auf Enterobacteriaceae und Salmonellen geprüften Proben (nach DRION und MOSSEL, 1977)

Auf Enterobacteriaceae (E) und Salmonellen (S) geprüfte Proben	6830
Positiv für S (50 - 100 g), positiv für E (1 - 2 g)	69
Negativ für S (50 - 100 g), positiv für E (1 - 2 g)	4642
Negativ für S (50 - 100 g), negativ für E (1 - 2 g)	2119

den gewesen waren, bei der Prüfung auf Enterobacteriaceae nicht erkannt worden waren. Dies trifft möglicherweise in besonderem Umfang für Trokkenmilchprodukte zu, zumal den von DRION und MOSSEL (1977) für die einzelnen Produkte aufgeschlüsselten Daten zu entnehmen ist, daß die errechnete Beziehung zwischen Nachweissicherheit mittels Enterobacteriaceae-Untersuchung und Nachweissicherheit mittels Salmonella-Untersuchung in erster Linie aus den Verhältnissen bei Getreideprodukten und Futtermitteln (4970 der in Tabelle 33 aufgeführten 6830 Produkte) abgeleitet wurde und Milchtrockenprodukte mangels Salmonella-positiver Befunde nicht einbezogen wurden.

In einem weiteren Experiment wurde geprüft, ob möglicherweise eine Beziehung zwischen MPN-Keimzahl an Enterobacteriaceae und evtl. nachzuweisenden Salmonellen besteht. Hierzu wurden zuerst Dreifachansätze mit 10 g - 1 g - 0,1 g durchgeführt. Da sich aber schon bald zeigte, daß die Produktmenge von 10 g - wie sie MOSSEL (1964) wählte - zu hoch war (stets Enterobacteriaceae-positiv), wurden später nur noch Dreifachsätze mit 1 g - 0,1 g - 0,01 g berücksichtigt. Von den 52 mit dieser MPN-Technik untersuchten Produktproben enthielten 28 Enterobacteriaceae, wobei sich der höchstwahrscheinliche Gehalt an diesen Keimen auf 0,4 bis mehr als 140/g belief. Salmonellen (untersuchte Menge jeweils 1 Probe à 25 g) wurden in 9 Proben nachgewiesen, und zwar ausschließlich in

solchen, aus denen bei Anwendung der MPN-Technik auch Enterobacteriaceae isoliert worden waren. Die höchstwahrscheinlichen Keimzahlen für Enterobacteriaceae schwankten allerdings ebenso wie bei den 19 Salmonella-freien Proben zwischen 0,4 und mehr als 140/g. Es kann infolgedessen auch nicht davon ausgegangen werden, daß zwischen der MPN-Keimzahl an Enterobacteriaceae und An- bzw. Abwesenheit von Salmonellen eine Beziehung besteht - selbst wenn die Relation bei der Salmonella-Untersuchung von 60 Proben à 25 g möglicherweise günstiger gewesen wäre. Auch wenn bei der gewählten MPN-Technik anders als bei der von DRION und MOSSEL (1972 und 1977) empfohlenen Enterobacteriaceae-Prüfung von 1 bzw. 2 x 1 g Material alle Salmonella-haltigen Proben erfaßt wurden, so kann hieraus jedoch nicht automatisch abgeleitet werden, daß die MPN-Technik einen wesentlich besseren Verbraucherschutz bietet. Diese Einschränkung ist erforderlich, weil - wie bereits erwähnt wurde - im Rahmen früherer Untersuchungen aus einer mit Salmonellen kontaminierten Charge Trockenkaseinat (7 Proben Salmonella-positiv!) durchschnittlich nur aus jeder fünften Probe à 1 g Enterobacteriaceae isoliert werden konnten und diese Charge somit höchstwahrscheinlich auch bei Anwendung der MPN-Technik mit drei Ansätzen pro 1 g - 0,1 g und 0,01 g nicht erkannt worden wäre.

Die Tatsache, daß in den untersuchten Trockenmilchproben wiederholt Enterobacteriaceae - auch in größeren Mengen/g - nachgewiesen wurden, ohne daß sich Salmonellen aus Einzelproben (25 g) isolieren ließen, war zu erwarten. Ähnliche Beobachtungen wurden u.a. auch von MOSSEL (1964), SILLIKER und GABIS (1976) sowie DRION und MOSSEL (1977) berichtet. Die Frage, ob unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse eine Beanstandung von Trockenmilchprodukten aufgrund des Nachweises von Enterobacteriaceae überhaupt gerechtfertigt ist, wird von DRION und MOSSEL (1977) mit folgenden Argumenten bejaht: Ein negativer Salmonellabefund besagt nicht, daß diese Keime nicht doch in der Probe vorhanden waren - die Abwesenheit von Salmonellen in Einzelproben beinhaltet nicht die Abwesenheit von Salmonellen auch in der Charge - trotz Abwesenheit

von Salmonellen können andere pathogene Enterobacteriaceae vorhanden sein. Ein weiterer Gesichtspunkt ist, daß die Anwesenheit von Enterobacteriaceae in Trockenmilchprodukten i.d.R. auf eine unzureichende Behandlung hinweist (Enterobacteriaceae als Indikator-Mikroorganismen nach der Definition von INGRAM (1977)) und in einer derartigen Situation durchaus mit der Anwesenheit pathogener Enterobacteriaceae (Salmonellen) gerechnet werden muß, auch wenn dies nicht zwangsläufig der Fall ist (MOSSEL, 1958; MOSSEL et al., 1978). Trotz dieser für die Vereinfachung des direkten Salmonella-Nachweises (mittels 60 Einzelproben à 25 g) sprechenden Überlegungen ist der Enterobacteriaceae-Nachweis (mittels 1 oder 2 Proben à 1 g (DRION und MOSSEL, 1972 und 1977) bzw. mittels MPN-Technik - drei Ansätze pro 1 g - 0,1 und 0,01 g -) bei Trockenmilchprodukten keine geeignete Alternative, um das Risiko einer Salmonellose mit der gleichen Wahrscheinlichkeit von 95 % (FOSTER, 1971) auszuschließen, da auch mit dem Vorkommen von Chargen zu rechnen ist, in denen Salmonellen vorhanden sind, obwohl Enterobacteriaceae nicht nachgewiesen werden können. Der Enterobacteriaceae-Nachweis bietet sich jedoch als einfacher Test für die Betriebskontrolle an, da das plötzliche Auftreten dieser Keime in von der Produktionslinie entnommenen Proben darauf hinweist, daß die Gesamtheit der technologischen Vorgänge zur Herstellung hygienisch einwandfreier Produkte unvollständig war und damit auch das Risiko der Anwesenheit von Salmonellen gegeben ist.

Abschließend soll noch kurz auf einige wichtige Beobachtungen zur Methodik der Untersuchung von Trockenmilchprodukten auf Salmonellen eingegangen werden.

1. In der DIN-Norm 10 181 zum Nachweis von Salmonellen in Milch, Milchprodukten und Speiseeis (Entwurf Juni 1979) wurde darauf hingewiesen, daß der pH-Wert der Voranreicherung nicht unter pH 5,0 absinken darf und in einem solchen Fall die Voranreicherung sofort abzubrechen ist. Eigene Untersuchungen wie auch Experimente von MÜLLER (1979a) haben aber gezeigt, daß pH-Werte des Voranreiche-

rungsmediums auch im Bereich von 5 bis 4,2 keinen schädigenden Einfluß auf die Lebensfähigkeit von Salmonellen, auch subletal geschädigten Keimen, zu haben scheinen. Infolgedessen sind - wie in ergänzenden Versuchen auch mit Milchzucker beobachtet wurde - bei der Voranreicherung keine Maßnahmen zur pH-Kontrolle erforderlich.

2. Bezüglich der Leistungsfähigkeit der beiden eingesetzten Hauptanreicherungen Tetrathionat-Brillantgrün-Galle-Bouillon nach MULLER-KAUFFMANN (modifiziert) und Selenit-Bouillon nach LEIFSON (modifiziert) waren bei Untersuchung von natürlich kontaminiertem Material keine wesentlichen Unterschiede zu erkennen. Auch REUSSE (1978) war zu einem ähnlichen Resultat gekommen. Zwar sind in der Literatur auch Hinweise auf die Überlegenheit eines der beiden Medien zu finden (siehe die umfangreiche Literaturzusammenstellung bei FAGERBERG und AVENS (1976) sowie MÜLLER (1980)), doch sollten hierbei auch die nachgewiesenermaßen zwischen Laboratorien bestehenden Unterschiede (VAN SCHOTHORST et al., 1980) berücksichtigt werden. Bei dem künstlich kontaminierten Material deutete sich zwar eine gewisse Tendenz zum positiven Nachweis aus jeweils nur einem der beiden Medien an, doch waren die Unterschiede nicht signifikant. Ob die Serovaren (CARLSON und SNOEYENBOS (1974) sowie ERDMAN (1974)) oder das verwendete Probenmaterial (SILLIKER und TAYLOR (1958)) hierfür in erster Linie verantwortlich sind oder andere Faktoren eine wesentliche Rolle spielen, kann aufgrund der begrenzten Untersuchungen nicht beurteilt werden. Doch bestätigt diese Beobachtung wiederum die Notwendigkeit einer zweigleisig durchgeführten Hauptanreicherung, wie sie z.B. BULLING und PIETZSCH (1966) unter Berücksichtigung der unterschiedlichen Empfindlichkeit einzelner Serovaren gegenüber den verschiedenen selektiven Substanzen forderten.

3. Die häufig als sehr vorteilhaft hingestellte zweite Abimpfung aus der Hauptanreicherung nach 48 h (siehe Übersicht bei REUSSE et al., 1975; REUSSE, 1978) erbrachte nicht die erwartete Steigerung der Isolierungsrate. Nur in einem einzigen Fall, nämlich bei einer künstlich

kontaminierten Sammelprobe, konnten nach 48, nicht aber bereits nach 24 h Salmonellen nachgewiesen werden. Umgekehrt traten allerdings einige nach 24 h positive und nach 48 h negative Ergebnisse auf, eine Beobachtung, von der auch REUSSE et al. (1975) berichten. Eine Abimpfung nach 24 h darf also auf keinen Fall unterbleiben.

4. Von den verwendeten festen Selektivnährböden zeigten der Brillantgrün-Phenolrot-Lactose-Saccharose-Agar (BGA) und der Salmonella-Shigella-Agar (SSA) bezüglich ihrer Ergiebigkeit keine signifikanten Unterschiede. Hingegen fielen die im Vergleich zum BGA sehr häufigen "falsch-positiven" Resultate auf dem SSA auf, eine Beobachtung, von der auch in der Literatur oft berichtet wird (TAYLOR et al., 1958; MONTFORD und THATCHER, 1961; YAMAMOTO et al., 1961; TAYLOR und SCHELHART, 1971; POLLOCK und DAHLGREN, 1974; ANDREWS et al., 1977). Auf BGA wuchsen zweimal Mikroorganismen, die aufgrund ihrer Koloniecharakteristika eventuell Anlaß zu Verwechslungen mit Salmonellen hätten geben können, später aber als Sporenbildner identifiziert wurden. Möglicherweise wirkt sich die gegenüber anderen Brillantgrün-Nährmedien erniedrigte Brillantgrünkonzentration negativ auf die Selektivität aus, doch hatten auch schon SILLIKER et al. (1964) von einem Wachstum grampositiver Keime auf BGA berichtet. Während in den eigenen Versuchen die gute Leistungsfähigkeit des BGA für die Untersuchung von Milchprodukten somit bestätigt werden konnte, sollte bezüglich des zweiten festen Selektivmedium in Betracht gezogen werden, den - nicht ausdrücklich vorgeschriebenen - SSA wegen der häufigen "falsch-positiven" Ergebnisse und dem damit gesteigerten Arbeits- und Materialaufwand durch einen selektiveren Nährboden zu ersetzen. Eigene Versuche mit dem von der Fa. Merck vertriebenen ÖNÖZ-Agar (ÖNÖZ und HOFFMANN, 1978), der aus den Komponenten des SSA und des Gaßner Agars zusammengesetzt ist, lassen zwar noch keine abschließende Aussage zu, doch scheint dieses Medium zumindest nicht mehr den Nachteil der eingeschränkten Elektivität zu besitzen. Zwar wurden bei den untersuchten Proben keine

lactosepositiven Salmonellen gefunden - dies könnte z.B. durch die begrenzte Anzahl der Herkunftsbetriebe bedingt sein - doch wird von mehreren Autoren (s. S.6, Tab. 4) auf deren Vorkommen in Trockenmilchprodukten hingewiesen und daraus die Notwendigkeit der Mitverwendung eines für ihren Nachweis geeigneten Mediums abgeleitet (RAY et al., 1971c). Der aufgrund seines nicht auf Lactosespaltung beruhenden Indikatorsystems für diesen Zweck empfohlene Wismut-Sulfit-Agar erwies sich bei den eigenen Untersuchungen allerdings ebenso wie bei anderen Untersuchern (s.a. Seite 8) als relativ wenig geeignet. (Es wurde jedoch nur das Produkt eines Herstellers verwendet). Auffallend war das unterschiedliche Erscheinungsbild, welches sogar die gleiche Serovar auf diesem Agar bieten konnte. In frisch zubereitetem Zustand unterblieb meist jedes Wachstum von Salmonellen, nach Lagerung (2-4 Tg.) traten neben den typischen schwarzen, metallisch-glänzenden auch grüne und braune Kolonien auf, die anschließend alle als Salmonellen identifiziert werden konnten. Außerdem zeigten häufig Kolonien anderer Keime die für Salmonellen typischen Merkmale. Der Einsatz dieses Mediums erfordert daher einen hohen Material- und Zeitaufwand für die Bestätigungsuntersuchungen.

5. Zusammenfassung

1. Im ersten Versuchsabschnitt wurde an verschiedenen Trockenmilchprodukten unter Anwendung standardisierter Salmonella-Nachweisverfahren (Norm-Entwurf DIN 10 181) geprüft, ob eine Rationalisierung der Untersuchung von 60 Einzelproben à 25 g, wie sie der FOSTER-Plan für Lebensmittel der Risikokategorie I vorschreibt, durch Zusammenfügen von jeweils 20 Einzelproben zu 3 Sammelproben à 500 g möglich ist. Bei natürlich kontaminiertem Material (Kalium-Kaseinat und Kasein) mit einer höchstwahrscheinlichen Keimzahl von 4 - 95 Salmonellen/500 g waren keine Unterschiede zwischen den Resultaten für die Einzelproben und den entsprechenden Sammelproben feststellbar. Bei künstlich mit den Serovaren S. panama, S. senftenberg und S. braenderup kontaminierten Materialien (Molken-, Magermilch-, Vollmilchpulver, Kalium-Kaseinat), mit höchstwahrscheinlichen Salmonella-Gehalten von 1 bis 15/500 g konnten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede zwischen Einzel- und entsprechenden Sammelproben beobachtet werden.

2. Im zweiten Versuchsabschnitt wurde mit dem in der Eiprodukte-VO vorgeschriebenen Verfahren unter Einbeziehung einer Voranreicherung geprüft, ob aus dem Nachweis von Enterobacteriaceae in Trokkenmilchprodukten auf die Anwesenheit von Salmonellen geschlossen werden kann. Bei der von DRION und MOSSEL (1972) empfohlenen Untersuchung von 1 Gramm- oder 2 x 1 Gramm-Material war zu registrieren, daß trotz negativer Enterobacteriaceae-Befunde in sieben (Kalium-Kaseinat) bzw. 13 (Kasein) Einzelproben einer Charge Salmonellen nachgewiesen wurden.

   Ergänzende Experimente ergaben, daß auch bei Anwendung der MPN-Technik (dreifacher Ansatz von jeweils 1 g - 0,1 g - 0,01 g) zwischen dem Enterobacteriaceae- und dem Salmonella-Nachweis keine Übereinstimmung gegeben sein muß.

3. Die Zusammenfassung von 60 Proben à 25 g zu drei Sammelproben (à 500 g) einer Charge eines Trockenmilchproduktes erbringt gegenüber der Untersuchung der einzelnen 60 Proben auf die Anwesenheit von Salmonellen vergleichbare Ergebnisse. Die Untersuchung von Sammelproben stellt somit eine wesentliche Rationalisierung des Salmonella-Nachweises bei Produkten der Risikokategorie I dar. Der Nachweis von Enterobacteriaceae als Index-Mikroorganismen für die mögliche Anwesenheit von Salmonellen beinhaltet zumindest bei Probenmengen von 1 g, 2 x 1 g bzw. 3 x 1 g einen deutlich schlechteren Verbraucherschutz als der direkte Salmonella-Nachweis (in 60 Einzelproben oder 3 Sammelproben) und kann daher diesen im Rahmen einer amtlichen Kontrolle nicht ersetzen. Der Enterobacteriaceae-Nachweis kann allerdings als Test für die betriebseigene Kontrolle in Erwägung gezogen werden. Plötzliches bzw. gehäuftes Auftreten von Enterobacteriaceae in einer Produktionslinie weist auf ein erhöhtes hygienisches Risiko hin.

Summary

1. In the first section of the experiments with dried milk products using standard methods for Salmonella isolation (Norm-Entwurf DIN 10 181), it was tested whether a rationalization of the examination of 60 individual samples of 25 g - as provided in the FOSTER-plan for foods of risk category No. I - could be achieved by pooling of 20 individual samples into 3 large samples of 500 g. With naturally contaminated material (potassium caseinate and casein) with a most probable number of 4 - 95 Salmonella per 500 g no difference could be observed between the results of the individual samples and those of the appropriate pooled samples. Similarly with artifically contaminated material (whey powder, skimmilk powder, dry whole milk, potassium caseinate) with a most probable number of Salmonella (S. panama, S. senftenberg, S. braenderup) between 1 - 15 per 500 g no significant differences between the individual and the appropriate pooled samples could be found.

2. In the second section of the experiments with dried milk products using a method provided in the Eiprodukte-VO including a preenrichment technique, it was tested whether the presence of Salmonella can be deduced from the detection of Enterobacteriaceae in these products. Following the recommendations of DRION and MOSSEL (1972) that 1 g or 2 x 1 g of material should be examined, Salmonella, however, could be detected despite negative Enterobacteriaceae results in 7 (potassium caseinate) and in 13 (casein) individual samples of a lot respectively. In additional experiments using the MPN-technique (threefold samples of 1 g - 0,1 g - 0,01 g) for the determination of Enterobacteriaceae it was shown, that there was not necessarily any correlation between the results for Enterobacteriaceae and Salmonella.

3. Pooling 60 samples of 25 g to 3 large samples (500 g) of a lot of a dried milk product yields results similar to those of the examination of 60 samples for the presence of Salmonella. Therefore testing of

pool samples represents an essential rationalization of the examination of products of risk category No. I for the presence of Salmonella. The detection of Enterobacteriaceae as index-microorganisms for the likely presence of Salmonella comprises at least with sample sizes of 1 g, 2 x 1 g, and 3 x 1 g respectively a considerably lesser consumer protection than the direct Salmonella assay (in 60 individual samples or 3 pool samples) and can for this reason not replace this assay within the surveillance. The Enterobacteriaceae assay can however be used as a test for the production control. The sudden or frequent occurrence of Enterobacteriaceae in the production line indicates an increased hygienic risk.

6. Literaturverzeichnis

ALFORD, J.A. und N.L. KNIGHT (1969):
Applicability of aeration and delayed addition of selenite to the isolation of salmonellae.
Appl. Microbiol. 18, 1060-1064.

ANDREWS, W.H., C.R. WILSON, P.L. POELMA und A. ROMERO (1977):
Comparison of methods for the isolation of Salmonella from imported frog legs.
Appl. Environ. Microbiol. 33, 65-68.

DIESELBEN (1979):
Relative productivity of five selective plating agars for the recovery of Salmonella from selected food types.
J. Ass. Off. Analyt. Chem. 62, 320-326.

BAIRD-PARKER, A.C., M. BOOTHROYD und M. JONES (1970):
The effect of water activity on the heat resistance of heat sensitive and heat resistant strains of salmonellae.
J. appl. Bact. 33, 515-522.

BARON, L.S., W.F. CAREY und W.M. SPILMANN (1959):
Characteristics of a high frequency of recombination (Hfr) strain of Salmonella typhosa compatible with Salmonella, Shigella and Escherichia species.
Proc. Nat. Acad. Sci. U.S.A. 45, 1752-1757.

BLACKBURN, B.O. und E.M. ELLIS (1973):
Lactose-fermenting Salmonella from dried milk and milk-drying plants.
Appl. Microbiol. 26, 672-674.

BLOBEL, H. und T. SCHLIESSER (1979):
Handbuch der bakteriellen Infektionen bei Tieren, Bd.I, p. 24-25.
Gustav Fischer Verlag, Stuttgart-New York.

BOMAR, M.T. (1978):
Berichtigung zu "Vorkommen von Salmonellen in kühlgelagerten Schlachthühnern" (diese Zeitschrift 28, 217-218, 1977).
Arch. Lebensmittelhyg. 29, 69.

BOMAR, M.T. und M.Z. HAJEK (1977):
Vorkommen von Salmonellen in kühlgelagerten Schlachthühnern.
Arch. Lebensmittelhyg. 28, 217-218.

BRYAN, F.L. (1968):
What the sanitarian should know about staphylococci and salmonellae in non-dairy products. II. Salmonellae.
J. Milk Food Technol. 31, 131-140.

BRYAN, F.L., M.J. FANELLI und H. RIEMANN (1979):
Salmonella infections.
in: RIEMANN, H. und F.L. BRYAN (Hrsg.), Food-borne infektions and intoxications, p. 73-130.
Academic Press, New York, San Francisco, London.

BUCHANAN, R.E. und N.E. GIBBONS (1974):
Bergey's manual of determinative bacteriology, p. 290-383.
The Williams and Wilkins Company, Baltimore.

BULLING, E. und O. PIETZSCH (1966):
Beiträge zur Salmonella-Diagnostik. II. Mitteilung: Über Salmonella-Anreicherungen und -Differenzierungsnährböden bei Lebensmitteluntersuchungen.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 79, 246-251.

BULMASH, J.M., M. FULTON und J. JIRON (1965):
Lactose and sulfide reactions of an aberrant Salmonella strain.
J. Bacteriol. 89, 259.

BUSSE, M. (1980):
Der Nachweis von Salmonellen im Rahmen der Produktionskontrolle - Anmerkung zu § 19 BSG.
Arch. Lebensmittelhyg. 31, 198-202.

BUSTA, F.F. (1976):
Practical implications of injured microorganisms in food.
J. Milk Food Technol. 39, 138-145.

BUSTA, F.F und M.L. SPECK (1968):
Antimicrobial effect of cocoa on salmonellae.
Appl. Microbiol. 16, 424-425.

BUTTIAUX, R. und D.A.A. MOSSEL (1961):
The significance of various organisms of faecal origin in foods and drinking water.
J. appl. Bact. 24, 353-364.

BYRNE, A.F., M.M. RAYMAN und M.D. SCHNEIDER (1955):
Methods for the detection and estimation of numbers of Salmonella in dried eggs and other food products.
Appl. Microbiol. 3, 368-372.

CAMPANINI, M. (1978):
Effect of water activity on the growth and survival of salmonellae and staphylococci. Industria Conserve 53, 270-276.
zit. nach Food Sci. Technol. Abstr. 11, 10B 105 (1979).

CARLSON, V.R. und G.H. SNOEYENBOS (1974):
Comparative efficiacies of selenite and tetrathionate enrichment broths for the isolation of salmonella serotypes.
Am. J. Vet. Res. 35, 711-718.

CHAU, P.Y. und Y.K. LEUNG (1978):
Inhibitory action of various plating media on the growth of certain Salmonella serotypes.
J. appl. Bact. 45, 341-345.

CHRISTIAN, J.H.B. (1980):
Reduced water activity. in: SILLIKER, J.H., R.P. ELLIOTT, A.C. BAIRD-PARKER, F.L. BRYAN, J.H.B. CHRISTIAN, D.S. CLARK, J.C. OLSON Jr. und T.A. ROBERTS (Hrsg.), Microbial ecology of foods, Vol. I. Factors affecting life and death of microorganisms, p. 70-91. Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco.

CHRISTIAN, J.H.B. und W.J. SCOTT (1953):
Water relations of salmonellae at 30°C.
Australian J. Biol. Sci. 6, 565-573.

CHRISTIAN, J.H.B. und B.J. STEWARD (1973):
Survival of Staphylococcus aureus and Salmonella newport in dried foods, as influenced by water activity and oxygen.
in: HOBBS, B.C. und J.H.B. CHRISTIAN (Hrsg.), The microbiological safety of food, p. 107-119.
Academic Press, London, New York.

CHUNG, K.C. und J.M. GOEPFERT (1970):
Growth of salmonella at low pH.
J. Food Sci. 35, 326-328.

CLARK, C.W. und Z.J. ORDAL (1969):
Thermal injury and recovery of Salmonella typhimurium and its effect on enumeration procedures.
Appl. Microbiol. 18, 332-336.

COLLARD, P. und M. UNWIN (1958):
A trial of Rappaport's medium.
J. clin. Path. 11, 426-427.

COLLINS, R.N., M.D. TREGER, J.B. GOLDSBY, J.R. BORING, D.B. COOHON und R.N. BARR (1968):
Interstate outbreak of Salmonella newbrunswick infection traced to powdered milk.
J. Am. Med. Assoc. 203, 838-844.

CORLETT Jr., D.A. und M.H. BROWN (1980):
pH and acidity. in: SILLIKER, J.H., R.P. ELLIOTT, A.C. BAIRD-PARKER, F.L. BRYAN, J.H.B. CHRISTIAN, D.S. CLARK, J.C. OLSON Jr. und T.A. ROBERTS (Hrsg.), Microbial ecology of foods.
Vol. I Factors affecting life and death of microorganisms, p. 92-111.
Academic Press, New York, London, Toronto, Sidney, San Francisco.

CORNELIS, G., D. GHOSAL und H. SAEDLER (1978):
Tn 951: a new transposon carrying a lactose operon.
Molec. gen. Genet. 160, 215-224.

CORRY, J.E.L. (1975):
The effect of water activity on the heat resistance of bacteria.
in: DUCKWORTH, R.B. (Hrsg.), Water relations of foods, p. 325-337.
Academic Press, London, New York, San Francisco.

CORRY, J.E.L., A.G. KITCHELL und T.A. ROBERTS (1969):
Interactions in the recovery of Salmonella typhimurium damaged by heat or gamma radiation.
J. appl. Bact. 32, 415-428.

COWAN, S.T. (1974):
Gram-negative facultatively anaerobic rods . Family I. Enterobacteriaceae.
in: BUCHANAN, R.E. und N.E. GIBBONS (Hrsg.), Bergey's manual of determinative bacteriology, p. 290-383.
The Williams and Wilkins Company, Baltimore.

COX, N.A., B.H. DAVIES, A.B. WATTS und A.R. COLMER (1972a):
Salmonella in the laying hen. 2. The effect of simulated digestive tract pH levels on the survival of three species of Salmonella.
Poultry Sci. 51, 1268-1270.

COX, N.A., B.H. DAVIS, J.H. KENDALL, A.B. WATTS und A.R. COLMER (1972b):
Salmonella in the laying hen. 3. A comparison of various enrichment broths and plating media for the isolation of Salmonella from poultry feces and poultry food products.
Poultry Sci. 51, 1312-1316.

CRAVEN, P.C., D.C. MACKEL, W.B. BAINE, W.H. BARKER, E.J. GANGAROSA, M. GOLDFIELD, H. ROSENFELD, R. ALTMAN, G. LACHAPELLE, J.W. DAVIES und R.C. SWANSON (1975):
International outbreak of Salmonella eastbourne infection traced to contaminated chocolate.
Lancet I, 788-793.

D'AOUST, J.Y. (1977):
Effect of storage conditions on the performance of bismuth sulfite agar.
J. Clin. Microbiol. 5, 122-124.

DERSELBE (1981):
Surfactants for the effective recovery of Salmonella in fatty foods.
Abstr. Ann. Meet. Am. Soc. Microbiol., p. 195.
81. Ann. Meet., 1. - 6. März 1981, Dallas, Texas.

D'AOUST, J.Y. und C. MAISHMENT (1979):
Preenrichment conditions for effective recovery of Salmonella in foods and feed ingredients.
J. Food Protec. 42, 153-157.

D'AOUST, J.Y., R. GÉLINAS und C. MAISHMENT (1980a):
Presence of indicator organisms and recovery of Salmonella in fish and shellfish.
J. Food Protec. 43, 679-682.

D'AOUST, J.Y., C. MAISHMENT, D.M. BURGENER, D.R. CONLEY, A. LOIT, M. MILLING und U. PURVIS (1980b):
Detection of Salmonella in refrigerated preenrichments and enrichment broth cultures.
J. Food Protec. 43, 343-345.

De MAN, J.C. (1975):
The probability of most probable numbers.
European J. Appl. Microbiol. 1, 67-78.

DIFCO (1953):
zit. nach: HARVEY, R.W.S. und T.H. PRICE (1979): A review.
Principles of salmonella isolation, p. 40.
J. appl. Bact. 46, 27-56.

DOESBURG, J.J., E.C. LAMPRECHT und M. ELLIOTT (1970):
Death rates of salmonellae in fishmeals with different water activities.
II. During heat treatment.
J. Sci. Fd. Agric. 21, 636-640.

DRÄGER, H. (1971):
Salmonellosen. Ihre Entstehung und Verhütung, p. 65-75.
Akademie-Verlag, Berlin-Ost.

DRION, E.F. und D.A.A. MOSSEL (1972):
Mathematical-ecological aspects of the examination for Enterobacteriaceae of foods processed for safety.
J. appl. Bact. 35, 233-239.

DIESELBEN (1977):
The reliability of the examination of foods, processed for safety, for enteric pathogens and Enterobacteriaceae: a mathematical and ecological study.
J. Hyg. Camb. 78, 301-324.

EASTERLING, S.B., E.M. JOHNSON, J.A. WOHLHIETER und L.S. BARON (1969):
Nature of lactose-fermenting Salmonella strains obtained from clinical sources.
J. Bacteriol. 100, 35-41.

EDEL, W. (1974):
Comparative studies on salmonella isolation.
Vet. Med. Diss., Utrecht.

EDEL, W. und E.H. KAMPELMACHER (1969):
Salmonella isolation in nine European laboratories using a standardized technique.
Bull. Wld. Hlth. Org. 41, 297-306.

DIESELBEN (1973):
Comparative studies on the isolation of "sublethally injured" salmonellae in nine European laboratories.
Bull. Wld. Hlth. Org. 48, 167-174.

EDWARDS, P.R. und M.A. FIFE (1961):
Lysin-iron agar in the detection of arizona cultures.
Appl. Microbiol. 9, 478-480.

EDWARDS, P.R. und W.H. EWING (1972):
Identification of enterobacteriaceae.
Burgess Publishing Company, Minneapolis.

EDWARDS, P.R., M.A. FIFE und W.H. EWING (1965):
Antigenic schema for the genus arizona.
U.S. DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION AND WELFARE (CENTER FOR DISEASE CONTROL), Atlanta, Georgia.

ELLIOTT, R.P. und P.K. HEINIGER (1965):
Improved temperature-gradient incubator and the maximal growth temperature and heat resistance of Salmonella.
Appl. Microbiol. 13, 73-76.

ERDMAN, I.E. (1974):
ICMSF methods studies. IV. International collaborative assay for the detection of Salmonella in raw meat.
Can. J. Microbiol. 20, 715-720.

ESCHMANN, K.H. (1970):
Getrocknete Lebensmittel.
Arch. Lebensmittelhyg. 21, 126-131.

FAGERBERG, D.J. und J.S. AVENS (1976):
Enrichment and plating methodology for salmonella detection in food. A review.
J. Milk Food Technol. 39, 628-646.

FALCAO, D.P., L.R. TRABULSI, F.W. HICKMAN und J.J. FARMER III (1975):
Unusual Enterobacteriaceae: lactose-positive Salmonella typhimurium which is endemic in Sao Paulo, Brazil.
J. Clin. Microbiol. 2, 349-353.

FALKOW, S. und L.S. BARON (1962):
Episomic element in a strain of Salmonella typhosa.
J. Bacteriol. 84, 581-589.

FERNANDES de TOLEDO, M.R., M.H. LEMOS dos REIS, J. MURAHOVSCHI, R. CURY, S.R.T. da SILVA RAMOS, E.S. FIORE, E.Y. SCHUSSEL und L.R. TRABULSI (1979):
Ocorrência de uma variante de Salmonella typhimurium que fermenta a lactose tardiamente.
Rev. Microbiol. (S. Paulo) 10, 103-106.

FISHBEIN, M., I.J. MEHLMAN, L. CHUGG und J.C. OLSON jr. (1976):
Coliforms, fecal coliforms, E.coli, and enteropathogenic E. coli.
in: SPECK, M.L. (Hrsg.), Compendium of methods for the microbiological examination of foods, p. 277-300.
Am. Pub. Hlth. Assoc., Washington D.C.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (1972):
Bacteriological analytical manual.
U.S. Department of Health, Education and Welfare, Washington D.C.

FOSTER, E.M. (1971):
The control of salmonellae in processed foods: a classification system and sampling plan.
J. Ass. Off. Analyt. Chem. 54, 259-266.

FURLONG, J.D., W. LEE, L.R. FOSTER und L.P. WILLIAMS (1979):
Salmonellosis associated with consumption of nonfat powdered milk - Oregon.
Morbidity and Mortality Weekly Report 28, 129-130.

GABIS, D.A. und B.E. LANGLOIS (1967):
Effect of cocoa powder used in chocolate milk on bacterial growth.
J. Dairy Sci. 50, 945.

GABIS, D.A. und J.H. SILLIKER (1974):
ICMSF methods studies. II. Comparison of analytical schemes for detection of Salmonella in high-moisture foods.
Can. J. Microbiol. 20, 663-669.

DIESELBEN (1977):
ICMSF methods studies. IX. The influence of selective enrichment broths, differential plating media, and incubation temperatures on the detection of Salmonella in dried foods and feed ingredients.
Can. J. Microbiol. 23, 1225-1231.

GENIGEORGIS, C. und H. RIEMANN (1979):
Food processing and hygiene. in: RIEMANN, H. und F.L. BRYAN (Hrsg.), Food-borne infections and intoxications, p. 613-713.
Academic Press, New York, San Francisco, London.

GEORGE, R.H. (1976):
Small infective doses of salmonella.
Lancet I, 1130.

GERICHTER, C.B. und I. SECHTER (1966):
Comparison of methods for the isolation of salmonella from bone meal.
Appl. Microbiol. 14, 711-715.

GIBSON, B. (1973):
The effect of high sugar concentrations on the heat resistance of vegetative micro-organisms.
J. appl. Bact. 36, 365-376.

GOEPFERT, J.M., I.K. ISKANDER und C.H. AMUNDSON (1970):
Relation of the heat resistance of salmonellae to the water aktivity of the environment.
Appl. Microbiol. 19, 429-433.

GONZALES, A.B. (1966):
Lactose - fermenting Salmonella.
J. Bacteriol. 91, 1661-1662.

GOVERD, K.A., F.W. BEECH, R.P. HOBBS und R. SHANNON (1979):
The occurence and survival of coliforms and salmonellas in apple juice and cider.
J. appl. Bact. 46, 521-530.

GUISO, N. und A. ULLMANN (1976):
Expression and regulation of lactose genes carried by plasmids.
J. Bacteriol. 127, 691-697.

HABS, H. (1976):
Zur Eindeutschung neuer Bezeichnungen des International Code of Nomenclature of Bacteria.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 235, 173-176.

DERSELBE (1979):
Nosologie, Epidemiologie und bakteriologische Taxonomie am Beispiel der Salmonella-Infektionen.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 243, 258-270.

HAJNA, A.A. (1945):
Triple-sugar iron agar medium for the identification of the intestinal group of bacteria.
J. Bacteriol. 49, 516-517.

HALL, H.E., D.F. BROWN und R. ANGELOTTI (1964):
The quantification of salmonellae in foods by using the lactose pre-enrichment method of North.
J. Milk Food Technol. 27, 235-240.

HALLMANN, L. und F. BURKHARDT (1974):
Klinische Mikrobiologie. Ausgewählte Untersuchungsmethoden für das bakteriologische, serologische, virologische und parasitologische Laboratorium, p. 111.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart.

HARRIGAN, W.F. und M.E. McCANCE (1976):
Laboratory methods in food and dairy microbiology, p. 386.
Academic Press, London - New York - San Francisco.

HARTMAN, P.A. (1979):
Modification of conventional methods for recovery of injured coliforms and salmonellae.
J. Food Protec. 42, 356-361.

HARVEY, R.W.S. und T.H. PRICE (1975):
Studies on the isolation of Salmonella dublin.
J. Hyg. Camb. 74, 369-374.

DIESELBEN (1979):
A review. Principles of salmonella isolation.
J. appl. Bact. 46, 27-56.

HARVEY, R.W.S., T.H. PRICE und E. XIROUCHAKI (1979):
Comparison of selenite F, Muller-Kauffmann tetrathionate and Rappaport's medium for the isolation of salmonellas from sewage-polluted natural water using a pre-enrichment technique.
J. Hyg. Camb. 83, 451-460.

HARWOOD, C.R. (1980):
Plasmids. in: GOODFELLOW, M. und R.G. BOARD, Microbiological classification and identification, p. 27-53.
Academic Press, London, New York, Toronto, Sidney, San Francisco.

HELDMAN, D.R., C.W. HALL und T.I. HEDRICK (1968):
Air filtration for the spray drying of dairy products.
J. Dairy Sci. 51, 466-470.

HENRIKSEN, S.D. (1955):
A study of the causes of discordant results of the presumptive and completed coliform tests on Norwegian waters.
Acta Pathol. Microbiol. Scand. 36, 87-95.

HOFER, E. (1969):
Über Abänderungen des Rappaport-Nährbodens.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. 210, 419-422.

HOOPER, W.L. und H.R. JENKINS (1965):
An evaluation of Rappaport's magnesium chloride / malachite green medium in the routine examination of faeces.
J. Hyg. Camb. 63, 491-495.

HUHTANEN, C.N. und J. NAGHSKI (1972):
Effect of type of enrichment and duration of incubation on salmonella recovery from meat- and -bone meal.
Appl. Microbiol. 23, 578-585.

HUHTANEN, C.N., J. NAGHSKI und E.S. DELLAMONICA (1972):
Efficiency of Salmonella isolation from meat- and -bone meal of one 300-g sample versus ten 30-g samples.
Appl. Microbiol. 23, 688-692.

HURST, A. (1977):
Bacterial injury: a review.
Can. J. Microbiol. 23, 935-944.

DERSELBE (1980):
Injury and its effect on survival and recovery.
in: SILLIKER, J.H., R.P. ELLIOTT, A.C. BAIRD-PARKER, F.L. BRYAN, J.H.B. CHRISTIAN, D.S. CLARK, J.C. OLSON Jr. und T.A. Roberts, Microbial ecology of foods. Vol. I Factors affecting life and death of microorganisms, p. 205-214.
Academic Press, New York, London, Toronto, Sydney, San Francisco.

INGRAM, M. (1977):
zit. nach: MOSSEL, D.A.A., P.G.H. BIJKER und I. EELDERINK (1978):
Streptokokken der Lancefield-Gruppe D in Lebensmitteln und Trinkwasser - ihre Bedeutung, Erfassung und Bekämpfung.
Arch. Lebensmittelhyg. 29, 121-127.

INGRAM, M., D.F. BRAY, D.S. CLARK, C.E. DOLMAN, R.P. ELLIOTT und F.S. THATCHER (Hrsg.) (1974):
Microorganisms in foods II. Sampling for microbiological analysis: principles and specific applications.
University of Toronto Press, Toronto, Buffalo 1974.

IVESON, J.B. und E.M. MACKAY-SCOLLAY (1972):
An evaluation of strontium chloride, Rappaport and strontium selenite enrichment for the isolation of salmonellas from man, animals, meat products and abattoir effluents.
J. Hyg. Camb. 70, 367-384.

JANSSEN, D.W. und F.F. BUSTA (1973):
Injury and repair of several Salmonella serotypes after freezing and thawing in milk solids.
J. Milk Food Technol. 36, 520-522.

JOHNSON, E.M., J.A. WOHLHIETER, B.P. PLACEK, R.B. SLEET und L.S. BARON (1976):
Plasmid - determined ability of a Salmonella tennessee strain to ferment lactose and sucrose.
J. Bacteriol. 125, 385-386.

KÄSTLI, P. (1957):
Der Einfluß der Milcherhitzung auf die Lebensfähigkeit von pathogenen Keimen und die Wirksamkeit ihrer Toxine.
Milchwissenschaft 12, 202-212.

KAUFFMANN, F. (1937):
Über eine lactosespaltende Salmonella Variante sowie die Definition der Salmonella Gruppe. Zeitschr. Hyg. und Infekt. 119, 352.
zit. nach: KAUFFMANN, F. (1966): The bacteriology of Enterobacteriaceae, p. 65.
Munksgaard, Kopenhagen.

DERSELBE (1960):
Two biochemical sub-divisions of the genus Salmonella.
Acta. Pathol. Microbiol. Scand. 49, 393-396.

DERSELBE (1964):
Das Kauffmann-White-Schema. in: VAN OYE, E. (Hrsg.), The world problem of salmonellosis, p. 22-66.
Dr. W. Junk Publishers, The Hague.

DERSELBE (1965):
Die Diagnose von Arizona-Kulturen nach dem originalen Kauffmann-White-Schema.
Path. Microbiol. 28, 575-589.

DERSELBE (1975):
Classification of bacteria. A realistic scheme with special reference to the classification of Salmonella- and Escherichia-species.
Munksgaard, Kopenhagen.

KEMPF, G. und O. PIETZSCH (1981):
Salmonellenprobleme in Tierkörperbeseitigungsanstalten.
I. Mitteilung: Salmonellen in Tierkörpermehl.
in Vorbereitung.

KLEEBERGER, A. (1978):
Bakteriologische Untersuchungsmethoden zur Qualitätsbeurteilung.
Deut. Milchwirt. 38, 1380-1385.

KRISTENSEN, M. (1955):
Mutative bacterial fermentation (8th communication).
Acta Pathol. Microbiol. Scand. 36, 576-580.

KÜHN, H., H. TSCHÄPE, H. RISCHE (1978):
Enterotoxigenicity among salmonellae - a prospective analysis for a surveillance programme.
Zbl. Bakt. Hyg., I.Abt. Orig. A 240, 171-183.

KUNZ, L.J. und W.H. EWING (1965):
Laboratory infection with a lactose-fermenting strain of Salmonella typhi.
J. Bacteriol. 89, 1629.

LACHAPELLE, G. (1979):
Salmonella dans les usines de lait en pondre au Québec.
Can. Inst. Food Sci. Technol. J. 12, 177-179.

LAPAGE, S.P., P.H.A. SNEATH, E.F. LESSEL, V.B.D. SKERMAN, H.P.R. SEELIGER und W.A. CLARK (1975):
International code of nomenclature of bacteria, p. 125-127.
American Society for Microbiology, Washington D.C.

LEIFSON, E. (1936):
New selenite enrichment media for the isolation of typhoid and paratyphoid (Salmonella) bacilli.
Am. J. Hyg. 24, 423-432.

LEISTNER, L. und W. RÖDEL (1976):
Inhibition of micro-organisms in food by water activity.
in: SKINNER, F.A. und W.B. HUGO (Hrsg.), Inhibition and inactivation of vegetative microbes, p. 219-237.
Academic Press, London, New York, San Francisco.

LEMMÉ, H. (1980):
Bekämpfung und Verhütung von Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen - eine internationale und interdisziplinäre Aufgabe.
Bundesgesundhbl. 23, 198-202.

LEUSSINK, A.B. (1975):
Statistical aspects of sampling.
Antonie van Leeuwenhoek 41, 378-379.

LiCARI, J.J. und N.N. POTTER (1970a):
Salmonella survival during spray drying and subsequent handling of skimmilk powder. I. Salmonella enumeration.
J. Dairy Sci. 53, 865-870.

DIESELBEN (1970b):
Salmonella survival during spray drying and subsequent handling of skimmilk powder. II. Effects of drying conditions.
J. Dairy Sci. 53, 871-876.

DIESELBEN (1970c):
Salmonella survival during spray drying and subsequent handling of skimmilk powder. III. Effects of storage temperature on salmonella and dried milk properties.
J. Dairy Sci. 53, 877-882.

DIESELBEN (1970d):
Salmonella survival differences in heated skimmilk and in spray drying of evaporated milk.
J. Dairy Sci. 53, 1287-1289.

LICCIARDELLO, J.J., J.T.R. NICKERSON und S.A. GOLDBLITH (1970):
Recovery of salmonellae from irradiated and unirradiated foods.
J. Food Sci. 35, 620-624.

LITCHFIELD, J.H. (1973):
Salmonella and the food industry - methods for isolation, identification and enumeration.
CRC Crit. Rev. Food Technol. 3, 415-456.

MARTH, E.H. (1969):
Salmonellae and salmonellosis associated with milk and milk products. A review.
J. Dairy Sci. 52, 283-315.

MATCHES, J.R. und J. LISTON (1972):
Effect of pH on low temperature growth of Salmonella.
J. Milk Food Technol. 35, 49-52.

MAYOU, J. (1976):
MPN - most probable number. in: SPECK, M.L. (Hrsg.), Compendium of methods for the microbiological examination of foods, p. 152-162.
Am. Pub. Hlth. Assoc., Washington D.C.

McCOY, J.H. (1962):
The isolation of salmonellae.
J. appl. Bact. 25, 213-224.

DERSELBE (1975):
Trends in salmonella food poisoning in England and Wales 1941-72.
J. Hyg. Camb. 74, 271-282.

McDONOUGH, F.E. und R.E. HARGROVE (1968):
Heat resistance of Salmonella in dried milk.
J. Dairy Sci. 51, 1587-1591.

MEASURES, J.C. (1975):
Role of animo acids in osmoregulation of non-halophilic bacteria.
Nature 257, 398-400.

MERCURI, A.J., N.A. COX, M.D. CARSON und D.A. TANNER (1978):
Relation of Enterobacteriaceae counts to Salmonella contamination of market broilers.
J. Food Protec. 41, 427-428.

MILLER, D.L., J.M. GOEPFERT und C.H. AMUNDSON (1972):
Survival of salmonellae and Escherichia coli during the spray drying of various food products.
J. Food Sci. 37, 828-831.

MONTFORD, J. und F.S. THATCHER (1961):
Comparison of four methods of isolating salmonellae from foods, and elaboration of a preferred procedure.
J. Food Sci. 26, 510-517.

MOSSEL, D.A.A. (1957):
The presumptive enumeration of lactose negative as well as lactose positive Enterobacteriaceae in foods.
Appl. Microbiol. 5, 379-381.

DERSELBE (1958):
Die Verhütung und Verbreitung von Salmonellosen und sonstigen Enteriobacteriosen durch Lebensmittel.
Zbl. Bakt. Hyg., 1. Abt. Ref. 166, 421-432.

DERSELBE (1964):
Eine mit dem Salmonella-Nachweis kommensurable Untersuchung von Lebens- und Futtermitteln auf Enterobacteriaceae.
Arch. Lebensmittelhyg. 15, 169-171.

DERSELBE (1967):
Ecological principles and methodological aspects of the examination of foods and feeds for indicator microorganisms.
J. Ass. Off. Analyt. Chem. 50, 90-104.

DERSELBE (1975a):
Water and micro-organisms in foods - a synthesis.
in: DUCKWORTH, R.B. (Hrsg.), Water relations of foods, p.347-361.
Academic Press, London , New York , San Francisco.

DERSELBE (1975b):
The choice of criteria derived from the types and numbers of harmful microorganisms in food.
Antonie van Leeuwenhoek 41, 373-375.

DERSELBE (1977):
Microbiology of foods. Occurence, preventation and monitoring of hazards and deterioration.
The University of Utrecht, Utrecht, The Netherlands.

MOSSEL, D.A.A. und M.A. RATTO (1970):
Rapid detection of sublethally impaired cells of Enterobacteriaceae in dried foods.
Appl. Microbiol. 20, 273-275.

MOSSEL, D.A.A. und J.E.L. CORRY (1977):
Detection and enumeration of sublethally injured pathogenic and index bacteria in foods and water processed for safety.
alimenta-Sonderausgabe 1977, 19-34.

MOSSEL, D.A.A., W.H.J. MENGERINK und H.H. SCHOLTS (1962):
Use of a modified MacConkey agar medium for the selective growth and enumeration of Enterobacteriaceae.
J. Bacteriol. 84, 381.

MOSSEL, D.A.A., M. VISSER und A.M.R. CORNELISSEN (1963):
The examination of foods for Enterobacteriaceae using a test of the type generally adopted for the detection of salmonellae.
J. appl. Bact. 26, 444-452.

MOSSEL, D.A.A., P.G.H. BIJKER und I. EELDERINK (1978):
Streptokokken der Lancefield-Gruppe D in Lebensmitteln und Trinkwasser - ihre Bedeutung, Erfassung und Bekämpfung.
Arch. Lebensmittelhyg. 29, 121-127.

MOSSEL, D.A.A., I. EELDERINK, M. KOOPMANS und F. VAN ROSSEM (1979):
Influence of carbon source, bile salts and incubation temperature on recovery of Enterobacteriaceae from foods using MacConkey-type agars.
J. Food Protec. 42, 470-475.

MÜLLER, H.E. (1979a):
Vergleichende Untersuchungen an verschiedenen Flüssigmedien zur Voranreicherung von Salmonellen in Milchpulver.
Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B 168, 367-376.

DERSELBE (1979b):
Über die unterschiedliche Infektiosität und Pathogenität von 187 Salmonella-Serotypen.
Bundesgesundhbl. 22, 329-338.

DERSELBE (1980):
Vergleichende Untersuchungen über die Effizienz von Selenit- und Tetrathionat-Brühe und von Leifson- und Wilson-Blair-Agar bei der Isolierung von Salmonellen.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 248, 202-209.

MULINDWA, D.K. und F.K. KÄFERSTEIN (1978):
Simultaneous detection of salmonellae, Escherichia coli type I (E. coli) and other enterobacteriaceae in dehydrated foods for infants and children.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 166, 72-80.

MULINDWA, D.K. und O. PIETZSCH (1979):
Studies on the influence of competitive Enterobacteriaceae flora on Salmonella isolation.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 243, 336-348.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE - NATIONAL RESEARCH COUNCIL. Committee on Salmonella, an evaluation of the Salmonella problem (1969): Washington D.C.
zit. nach: SILLIKER, J.H. und D.A. GABIS (1973):
ICMSF methods studies. I. Comparison of analytical schemes for detection of Salmonella in dried foods.
Can. J. Microbiol. 19, 475-479.

DIESELBEN (1970):
An evaluation of the salmonella problem: summary and recommendations.
J. Milk Food Technol. 33, 42-51.

DIESELBEN (1971):
Reference methods for the microbiological examination of foods.
Food Protection Committee. Food and Nutrition board.
Division of Biology and Agriculture.

NG, H., H.G. BAYNE und J.A. GARIBALDI (1969):
Heat resistance of salmonella: the uniqueness of Salmonella senftenberg 775W
Appl. Microbiol. 17, 78-82.

NORTH, W.R. (1961):
Lactose pre-enrichment method for isolation of Salmonella from dried egg albumen.
Appl. Microbiol. 9, 188-195.

NOVICK, R.P. (1981):
Plasmide.
Spektrum der Wissenschaft Febr. 1981, 34-51.

OBLINGER, J.L. und J.A. KOBURGER (1975):
Understanding and teaching the most probable number technique.
J. Milk Food Technol. 38, 540-545.

ÖNÖZ, E. und K. HOFFMANN (1978):
Erfahrungen mit einem neuen Nährboden für die Salmonella-Diagnostik.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 240, 16-21.

OLSON, J.C. jr. (1975):
Development and present status of FDA Salmonella sampling and testing plans.
J. Milk Food Technol. 38, 369-371.

OXOID (1977):
Handbuch der OXOID-Erzeugnisse für mikrobiologische Zwecke, p. 231.
OXOID-Deutschland GmbH, Wesel.

PARK, C.E., M.K. RAYMAN, K. STANKIEWICZ und A.H.W. HAUSCHILD (1977):
Preenrichment procedure for detection of Salmonella in gelatin.
Can. J. Microbiol. 23, 559-562.

PARK, C.E., Z.K. STANKIEWICZ, M.K. RAYMAN und A.H.W. HAUSCHILD (1979):
Inhibitory effect of cocoa powder on the growth of a variety of bacteria in different media.
Can. J. Microbiol. 25, 233-235.

PEARCE, L.H. (1979):
Effect of storage at ambient and elavated temperatures and of gamma irradiation on Salmonella anatum in casein.
New Zealand J. Dairy Sci. Technol. 14, 227-232.

PIETZSCH, O. (1976):
Standardisierung des Salmonella-Nachweisverfahrens bei Lebensmitteluntersuchungen.
Bundesgesundhbl. 19, 148-149.

DERSELBE (1978):
Verbreitung der Salmonella-Infektionen bei Tieren, tierischen Lebens- und Futtermitteln in der Bundesrepublik Deutschland einschl. Berlin (West).
Jahresberichte 1975-1976.
Bundesgesundhbl. 21, 389-411.

DERSELBE (1981):
Persönliche Mitteilung.

PIETZSCH, O. und D.K. MULINDWA (1978):
Spezielle Aspekte bei der Voranreicherung von Salmonellen.
Arch. Lebensmittelhyg. 29, 145-146.

PIETZSCH, O., F.-J. KRETSCHMER und E. BULLING (1975):
Vergleichsuntersuchungen über Salmonella-Anreicherungsverfahren.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 232, 232-246.

PÖHN, H.-P. (1977):
Salmonella-newport-Infektionen durch Säuglingsnahrung in der Bundesrepublik Deutschland.
Bundesgesundhbl. 20, 149.

DERSELBE (1979):
Salmonellose-überwachung beim Menschen in der Bundesrepublik Deutschland einschl. Berlin (West) 1976.
Bundesgesundhbl. 22, 29-39.

DERSELBE (1980):
Salmonellose-Überwachung beim Menschen in der Bundesrepublik Deutschland einschl. Berlin (West) 1977.
Jahresbericht des Zentralen Salmonellose-Überwachungsprogramms.
Bundesgesundhbl. 23, 225-243.

POELMA, P.L. und A. ROMERO (1971):
Media to improve flagellar development for salmonella flagellar (H) test.
J. Ass. Off. Analyt. Chem. 54, 745-746.

POELMA, P.L. und J.H. SILLIKER (1976):
Salmonella. in: SPECK, M.L. (Hrsg.), Compendium of methods for the microbiological examination of foods, p. 301-328.
American Public Health Association, Inc. Washington D.C.

POELMA, P.L., C.R. WILSON, A. ROMERO und A. PADRON (1969):
Detection and identification of Salmonella from dry milk: report of a collaborative study.
J. Ass. Off. Analyt. Chem. 52, 455-458.

POLLOCK, H.M. und B.J. DAHLGREN (1974):
Clinical evaluation of enteric media in the primary isolation of salmonella and shigella.
Appl. Microbiol. 27, 197-201.

PRICE, W.R., R.A. OLSEN und J.E. HUNTER (1972):
Salmonella testing of pooled pre-enrichment broth cultures for screening multiple food samples.
Appl. Microbiol. 23, 679-682.

RAPPAPORT, F., N. KONFORTI und B. NAVON (1956):
A new enrichment medium for certain salmonellae.
J. clin. Path. 9, 261-266.

RAY, B. (1979):
Methods to detect stressed microorganisms.
J. Food Protec. 42, 346-355.

RAY, B., J.J. JEZESKI und F.F. BUSTA (1971a):
Effect of rehydration on recovery, repair, and growth of injured freeze-dried Salmonella anatum.
Appl. Microbiol. 22, 184-189.

DIESELBEN (1971b):
Repair of injury in freeze-dried Salmonella anatum.
Appl. Microbiol. 22, 401-407.

DIESELBEN (1971c):
Isolation of salmonellae from naturally contaminated dried milk products.
I. Influence of sampling procedure on the isolation of salmonellae.
J. Milk Food Technol. 34, 389-393.

DIESELBEN (1971d):
Isolation of salmonellae from naturally contaminated dried milk products.
II. Influence of storage time on the isolation of salmonellae.
J. Milk Food Technol. 34, 423-427.

RAY, B., D.W. JANSSEN und F.F. BUSTA (1972a):
Characterization of the repair of injury induced by freezing Salmonella anatum.
Appl. Microbiol. 23, 803-809.

RAY, B., J.J. JEZESKI und F.F. BUSTA (1972b):
Isolation of salmonellae from naturally contaminated dried milk products.
III. Influence of pre-enrichment conditions.
J. Milk Food Technol. 35, 607-614.

REUSSE, U. (1978):
Nachweismethoden von Salmonellen und Enterobacteriaceen.
Arch. Lebensmittelhyg. 29, 138-145.

REUSSE, U. und R. GEISTER (1978):
Salmonellenabwehr durch Stichprobenuntersuchungen nach dem "FOSTER-Plan".
Arch. Lebensmittelhyg. 29, 222-225.

REUSSE, U., A. HAFKE und A. MEYER (1975):
Erfahrungen bei der Isolierung von Salmonellen und Enterobacteriaceen.
Arch. Lebensmittelhyg. 26, 137-143.

REUSSE, U., A. HAFKE und R. GEISTER (1976):
Feststellung des Enterobacteriaceen-Gehaltes von Fischmehl zur Beurteilung der Salmonellenfreiheit.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B, 162, 288-306.

ROHDE, R. (1967):
Zur serologischen Differentialdiagnose der Salmonella sub-genera I-IV.
Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. 205, 404-424.

DERSELBE (1979):
Serologische Integration aller bekannten Arizona-Species in das Kauffmann-White-Schema.
Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 243, 148-176.

RUSCHKE, R. (1980):
Salmonella-Abtötung durch Wärme bei der Zubereitung von Lebensmittel-Trockenprodukten.
Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B 170, 529-538.

SAPHRA, I. und E. SELIGMANN (1947):
Coliforms with complete salmonella antigens, or lactose-fermenting salmonellae?
J. Bacteriol. 54, 270-271.

SCHROEDER, S.A. (1967):
What the sanitarian should know about salmonellae and staphylococci in milk and milk products.
J. Milk Food Technol. 30, 376-380.

SCHUBERT, R. (1977/78):
Probleme der Qualitätskontrolle von zuckerhaltigen Lebensmitteln im Hinblick auf die Erfassung von darmpathogenen Mikroorganismen.
alimenta-Sonderausgabe 1977/78, 30-40.

SEELIGER, H.P.R. und A.E. MAYA (1964):
Epidemiologie der Salmonellosen in Europa 1950-1960 (ausgenommen Osteuropa). in: VAN OYE, E. (Hrsg.) (1964): The world problem of salmonellosis, p. 245-294.
Dr. W. Junk Publishers, The Hague.

SEELIGER, H. (1952):
Die Keimzahlbestimmung und Differenzierung coliformer Bakterien in Milch und Speiseeis.
Milchwissenschaft 7, 389-394.

SELIGMANN, E. und I. SAPHRA (1946):
A coliform bacterium with the complete antigen of Salmonella newington.
J. Immunol. 54, 275-282.

SIEMS, H. (1974):
Verfahren zur Kultivierung von subletal geschädigten Salmonellen aus Lebensmitteln.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 87, 273-276.

DERSELBE (1978):
Erfahrungen bei der Isolierung von Salmonellen aus Lebensmitteln unterschiedlicher Risikokategorien.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 167, 120-128.

SILLIKER, J.H. (1969):
zit. nach: SILLIKER, J.H. und D.A. GABIS (1973):
ICMSF methods studies. I. Comparison of analytical schemes for detection of Salmonella in dried foods.
Can. J. Microbiol. 19, 475-479.

DERSELBE (1980):
Status of Salmonella - ten years later.
J. Food Protec. 43, 307-313.

SILLIKER, J.H. und W.I. TAYLOR (1958):
Isolation of salmonellae from food samples. II. The effect of added food samples upon the performance of enrichment broths.
Appl. Microbiol. 6, 228-232.

SILLIKER, J.H. und D.A. GABIS (1973):
ICMSF methods studies. I. Comparison of analytical schemes for detection of Salmonella in dried foods.
Can. J. Microbiol. 19, 475-479.

DIESELBEN (1976):
ICMSF methods studies. VII. Indicator tests as substitutes for direct testing of dried foods and feeds for Salmonella.
Can. J. Microbiol. 22, 971-974.

SILLIKER, J.H., R.H. DEIBEL und P.T. FAGAN (1964):
Enhancing effect of feces on isolation of salmonellae from selenite broth.
Appl. Microbiol. 12, 100-105.

SILLIKER, J.H., R.H. DEIBEL und J.J. CHIN (1964b):
Occurence of gram-positive organisms possessing characteristics similar to those of Salmonella and the practical problem of rapid and definitive Salmonella identification.
Appl. Microbiol. 12, 395-399.

SINELL, H.-J. und H. SIEMS (1978):
Vorkommen von Salmonellen in kühlgelagerten Schlachthühnern. - Eine Stellungnahme zu dem gleichnamigen Artikel von BOMAR und HAJEK (diese Zeitschrift 28, 217-218, 1977) -
Arch. Lebensmittelhyg. 29, 69-70.

SINELL, H.-J. und H. KOLB (1980):
Lebensmittelinfektionen und -intoxikationen in der Bundesrepublik Deutschland.
Bundesgesundhbl. 23, 190-194.

SOLBERG, M., D.K. MISKIMIN, B.A. MARTIN, G. PAGE, S. GOLDNER und M. LIBFELD (1976):
What do microbiological indicator tests tell us about the safety of foods.
Food Product Development, Nov. 1976, 72-79.
zit. nach: RUSCHKE, R. (1980): Salmonella-Abtötung durch Wärme bei der Zubereitung von Lebensmittel-Trockenprodukten.
Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. B 170, 529-538.

SPERBER, W.H. (1981):
The influence of water activity on food-borne bacteria.
A seminar presented at the American Society for Microbiology Convention, March 4, 1981, Dallas, Texas.

STOKES, J.L. und H.G. BAYNE (1957):
Growth rates of salmonella colonies.
J. Bacteriol. 74, 200-206.

SYNENKI, R.M., J.A. WOHLHIETER, E.M. JOHNSON, J.R. LAZERE und L.S. BARON (1973):
Isolation and characterization of circular deoxyribonucleic acid obtained from lactose-fermenting Salmonella strains.
J. Bacteriol. 116, 1185-1190.

TAYLOR, J. (1969):
Salmonella and salmonellosis. in: TAYLOR, J. (Hrsg.),
Bacterial food poisoning, p. 23-47.
Cox and Wyman Ltd., London, Reading, Fakenham.

TAYLOR, W.I. (1961):
Isolation of salmonellae from food samples. V. Determination of the method of choice for enumeration of Salmonella.
Appl. Microbiol. 9, 487-490.

DERSELBE (1965):
Isolation of shigellae. I. Xylose-lysine-agars: new media for isolation of enteric pathogens.
Am. J. Clin. Path. 44, 471-475.

TAYLOR, W.I. und J.H. SILLIKER (1961):
Isolation of salmonellae from food samples. IV. Comparison of methods of enrichment.
Appl. Microbiol. 9, 484-486.

TAYLOR, W.I. und D. SCHELHART (1971):
Isolation of shigellae. VIII. Comparison of xylose lysine deoxycholate agar, Hektoen enteric agar, Salmonella - Shigella agar, and eosin methylene blue agar with stool specimens.
Appl. Microbiol. 21, 32-37.

TAYLOR, W.I., J.H. SILLIKER und H.P. ANDREWS (1958):
Isolation of salmonellae from food samples. I. Factors affecting the choice of media for the detection and enumeration of salmonella.
Appl. Microbiol. 6, 189-193.

TERPLAN, G. (1980):
Persönliche Mitteilung.

THATCHER, F.S. und D.S. CLARK (1968):
Microorganisms in foods: their significance and methods of enumeration.
University of Toronto Press, Canada.

THOMAS, M.-J. (1970):
Zur Bestimmung des Milchkeimgehaltes nach dem MPN-Prinzip.
Vet. Med. Diss., Hannover

TIWARI, N.P. und R.B. MAXCY (1972):
Post-irradiation evaluation of pathogens and indicator bacteria.
J. Food Sci. 37, 485-487.

TODD, E.C.D. (1978):
Foodborne disease in six countries - a comparison.
J. Food Protec. 41, 559-565.

TRICHOPOULOS, D., J.A. PAPADAKIS, D. KARALIS und P. VASSILIADIS (1975):
Incubation at raised temperature of enrichment media, combined with secondary enrichment in Rappaport's medium for the isolation of salmonellas from sewage.
J. Hyg. Camb. 74, 205-213.

TROLLER, J.A. (1980):
Influence of water activity on microorganisms in foods.
Food Technol. 34 (5), 76-82.

TROLLER, J.A. und J.H.B. CHRISTIAN (1978):
Water activity and food.
Academic Press, New York, San Francisco, London.

TWORT, F.W. (1907):
The fermentation of glucosides by bacteria of the typhoid coli group and the acquisition of new fermenting powers by Bacillus dysenteriae and other micro-organisms.
Roy. Soc. London Proc. 79 B, 329-336.

U.S. DEPARTMENT OF HEALTH, EDUCATION, AND WELFARE (1976):
Foodborne and waterborne disease outbreaks, annual summary, 1975.
Center for Disease Control, Atlanta, Georgia.

DIESELBEN (1979):
Foodborne and waterborne disease surveillance, annual summary 1977.
Center for Disease Control, Atlanta, Georgia.

VAN SCHOTHORST, M. und E.H. KAMPELMACHER (1968):
Comparative studies on the isolation of salmonellae from dry feed ingredients.
in: KAMPELMACHER, E.H., M. INGRAM und D.A.A. MOSSEL.
The microbiology of dried foods. Proceedings of the sixth international symposium on food microbiology, p. 193-209.
Bilthoven, The Netherlands, Juni 1968.

VAN SCHOTHORST, M. und F.M. VAN LEUSDEN (1972):
Studies on the isolation of injured salmonellae from foods.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 221, 19-29.

DIESELBEN (1975):
Further studies on the isolation of injured salmonellae from foods.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. A 230, 186-191.

VAN SCHOTHORST, M., D.A.A. MOSSEL, E.H. KAMPELMACHER und E.F. DRION (1966):
The estimation of the hygienic quality of feed components using an Enterobacteriacea enrichment test.
Zbl. Vet. Med. B 13, 273-285.

VAN SCHOTHORST, M., F.M. VAN LEUSDEN, J. JEUNINK und J. de DREN (1977):
Studies on the multiplication of salmonellae in various enrichment media at different incubation temperatures.
J. appl. Bact. 42, 157-163.

VAN SCHOTHORST, M., R.J. GILBERT, R.W.S. HARVEY, O. PIETZSCH und E.H. KAMPELMACHER (1978):
Comparative studies on the isolation of salmonella from minced meat.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 167, 138-145.

VAN SCHOTHORST, M., F.M. VAN LEUSDEN, E. de GIER, V.F.M. RIJNIERSE und A.J.D. VEEN (1979):
Influence of reconstitution on isolation of Salmonella from dried milk.
J. Food Protec. 42, 936-937.

VAN SCHOTHORST, M., F.M. VAN LEUSDEN, A.C. GHOSH, M.P.M. HOFSTEE, T.H. PRICE, I. SIMON, R.J. GILBERT, R.W.S. HARVEY, O. PIETZSCH und E.H. KAMPELMACHER (1980):
Laboratory induced variations in a standardized salmonella isolating method.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 171, 224-230.

VASSILIADIS, P., D. TRICHOPOULOS, J. PAPADAKIS und G. POLITI (1970):
Salmonella isolations in abattoirs in Greece.
J. Hyg. Camb. 68, 601-609.

VASSILIADIS, P., E. PATERAKI, J. PAPADAKIS und D. TRICHOPOULOS (1974):
Evaluation of the growth of salmonellae in Rappaport's broth and in Muller-Kauffmann's tetrathionate broth.
J. appl. Bact. 37, 411-418.

VASSILIADIS, P., D. TRICHOPOULOS, A. KALANDIDI und E. XIROUCHAKI (1978a):
Isolation of salmonellae from sewage with a new procedure of enrichment.
J. appl. Bact. 44, 233-239.

VASSILIADIS, P., D. TRICHOPOULOS, E. PATERAKI und N. PAPAICONOMOU (1978b):
Isolation of salmonella from minced meat by the use of a new procedure of enrichment.
Zbl. Bakt. Hyg., I. Abt. Orig. B 166, 81-86.

VASSILIADIS, P., D. TRICHOPOULOS, G. PAPOUTSAKIS und E. PALLANDIOU (1979):
A note on the comparison of two modifications of the Rappaport's medium with selenite broth in the isolation of salmonellas.
J. appl. Bact. 46, 567-569.

VASSILIADIS, P., E. PATERAKI, N. PAPAICONOMON, J.A. PAPADAKIS und D. TRICHOPOULOS (1976):
Nouveau procédé d'enrichessement de Salmonella.
Annal. Microbiol. Inst. Past. 127 B, 195-200.

WEISS, H., G. HILDEBRAND und H. BERNER (1977):
Prüfpläne zur Beurteilung des direkten bzw. indirekten Nachweises von Salmonellen in Lebensmitteln.
Arch. Lebensmittelhyg. 28, 128-135.

WEISSMAN, J.B., R.M.A.D. DEEN, M. WILLIAMS, N. SWANSTON und S. ALI (1977):
An island-wide epidemic of salmonellosis in Trinidad traced to contaminated powdered milk.
West Indian Medical Journal 26, 135-143.

WERNERY, U. und T. ZIMMERMANN (1981):
Vergleichende quantitative Untersuchungen zum Nachweis subletal geschädigter Salmonellen in Tierkörpermehlen.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 94, 14-16.

WILSON, J.M. und R. DAVIES (1976):
Minimal medium recovery of thermally injured Salmonella senftenberg 4969.
J. appl. Bact. 40, 365-374.

WILSON, W.J. (1938):
Isolation of Bact. typhosum by means of bismuth sulphite medium in water and milk-borne epidemics.
J. Hyg. Camb. 38, 507-519.

WILSON, W.J. und E.M. McV. BLAIR (1927):
Use of a glucose bismuth sulphite iron medium for the isolation of B.typhosus and B.proteus.
J. Hyg. Camb. 26, 374-391.

WINKLE, S. und R. ROHDE (1979):
Epidemiologische und seuchenprophylaktische Erfahrungen aus der 25-jährigen Tätigkeit der Hamburger Salmonella-Zentrale.
Zbl. Bakt. Hyg. I. Abt. Orig. A 243, 392-411.

WOHLHIETER, J.A., J.R. LAZERE, N.J. SNELLINGS, E.M. JOHNSON, R.M. SYNENKI und L.S. BARON (1975):
Characterization of transmissible genetic elements from sucrose-fermenting Salmonella strains.
J. Bacteriol. 122, 401-406.

YAMAMOTO, R., W.W. SADLER, H.E. ADLER und G.F. STEWART (1961):
Comparison of media and methods for recovering Salmonella typhimurium from turkeys.
Appl. Microbiol. 9, 76-80.

YOSHIKAWA, T.T., P. HERBERT und P.A. OILL (1980):
Salmonellosis.
West. J. Med. 133, 408-417.

YOSHIMURA, H., N. NAKAMURA und S. SATO (1979):
Incidence of salmonellae in animal feed ingredients in Japan.
Nat. Inst. Anim. Hlth. Quart. 19, 107-113.

ZAPATKA, F.A., G.W. VARNEY und A.J. SINSKEY (1977):
Neutralization of the bactericidal effect of cocoa powder on salmonellae by casein.
J. appl. Bact. 42, 21-25.

ZIMMERMANN, T. und U. WERNERY (1979):
Untersuchungen zum Nachweis durch Hitzebehandlung subletal geschädigter Salmonellen.
Berl. Münch. Tierärztl. Wschr. 92, 441-445.

Abschließend möchte ich Herrn Prof. Dr. G. Terplan für die Überlassung des Themas und seine Anleitungen danken.

Ganz besonders bedanke ich mich auch bei Herrn Dr. K.-J. Zaadhof für die stets gern gewährte Hilfe und Beratung.

Weiterhin danke ich Frau Gonzales, Frau Kaser und Frau Stemmer, die bei der Durchführung der praktischen Arbeiten halfen, sowie Frau Spensberger für das Schreiben der Arbeit.

Die Untersuchungen wurden zum Teil mit finanzieller Unterstützung des Bundesministeriums für Jugend, Familie und Gesundheit durchgeführt.

Lebenslauf

Am 20. März 1948 wurde ich, Heinz Becker, als Sohn des Kaufmannes Willy Becker und seiner Frau Margot, geb. Sinzig, in Bad Godesberg geboren.

Nach Besuch der Volksschule in Mülheim/Ruhr und Köln bestand ich am Karlsgymnasium in München-Pasing im Juni 1970 die Reifeprüfung.

Im April 1971 immatrikulierte ich mich an der Ludwig-Maximilians-Universität in München und begann, nach anfänglichem Studium der Zeitungswissenschaft, im Wintersemester 1973 das Studium der Tiermedizin, das ich im Juli 1979 mit dem Staatsexamen beendete. Im August 1979 erhielt ich die Approbation als Tierarzt.

Seit September 1979 bin ich als wissenschaftlicher Assistent am Lehrstuhl für Hygiene und Technologie der Milch tätig.